

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
MANEL GHRIBI

LA BIODIVERSITÉ MICROBIENNE DES DÉCHETS (BOUES PAPETIÈRES ET  
HUILES USÉES) ET SON POTENTIEL D'APPLICATION ENZYMATIQUE

SEPTEMBRE 2019

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

# UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

**Cette thèse a été dirigée par :**

---

Marc Beauregard, Ph. D.

Université du Québec à Trois-Rivières

**Jury d'évaluation de la thèse :**

---

Marc Beauregard, Ph. D.

Université du Québec à Trois-Rivières

---

Simon Barnabé, Ph. D.

Université du Québec à Trois-Rivières

---

Marc Sirois, Ph. D.

Université du Québec à Trois-Rivières

---

Caroline Duchaine, Ph. D.

Université Laval

Thèse soutenue le 5 septembre 2019

*We live on an island surrounded by a sea of  
ignorance. As our island of knowledge grows,  
so does the shore of our ignorance.*

John Archibald Wheeler

## REMERCIEMENTS

Je suis très chanceuse d'avoir eu l'occasion de travailler avec tous ces gens formidables durant mes études de cycles supérieurs. J'aimerais premièrement remercier mon directeur de recherche, le professeur Marc Beauregard qui a été un superviseur fantastique et un homme honnête et intègre avec qui j'espère continuer de collaborer dans le futur. Je remercie aussi tout particulièrement l'agent de recherche, Dre Fatma Meddeb, qui m'a accueilli et initié aux techniques de biologie moléculaire lors de mon arrivée au laboratoire et avec qui j'ai partagé des moments de recherches, de discussion et de découvertes mémorables et qui a été pour moi comme une amie et une mère à la fois.

Je remercie également tous les membres du laboratoire : Jessica Kelly Moisan, Yannick Hébert-Ouellet, Li Cui, Vinay Khatri et Xiména Zottig. Je garde d'excellents souvenirs de toutes ces années, que ce soit dans le laboratoire, les congrès ou à l'extérieur des études. Ce sont des gens formidables qui ont enrichi ma vie. Je tiens à remercier particulièrement ma famille, mon père Hamedh, mon neurone moteur, ma mère Monia, mon premier fan, et ma sœur et meilleure amie Nour. Ces personnes formidables m'ont supporté tout au long de ma vie et m'ont tellement encouragé et aidé. Je remercie également Juan Carlos, d'être toujours présent même de loin pour me motiver, m'encourager et me soutenir. Je remercie du fond du cœur tous mes amis, mes collègues des autres laboratoires que j'ai fréquentés lors de ces quatre années entre maîtrise et doctorat.

La réalisation de cette thèse fut une occasion merveilleuse de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes. Je ne saurais pas les citer toutes. Je reconnais que chacune a, à des degrés divers, mais avec une égale bienveillance, apporté une contribution positive à la finalisation de mes études supérieures. Mes dettes de reconnaissance sont, à ce point de vue, énormes à leur égard.

## AVANT-PROPOS

C'est en 1988 qu'on a mentionné pour la première fois les termes « biodiversité et diversité biologique ». La biodiversité, mot composé de bio (du grec βίος « vie ») et « diversité », est la diversité de la vie sur la Terre. Elle s'apprécie en considérant la diversité des écosystèmes, des espèces et des gènes dans l'espace et dans le temps, ainsi que les interactions au sein de ces niveaux d'organisation et entre eux. Parmi les différents aspects de la biodiversité, on s'intéresse de plus en plus à la biodiversité des microorganismes. Bien que l'existence des micro-organismes ait été révélée par les premiers microscopes, il a fallu pourtant attendre, près de trois cents ans, les travaux de Pasteur et de ses contemporains pour découvrir l'importance des bactéries dans la vie de l'homme. Ce fut alors l'extraordinaire épanouissement de la bactériologie médicale. Depuis, ont commencé à découler toutes les applications industrielles intéressantes des microorganismes. Largement répandues dans le sol et les eaux, ils jouent un rôle fondamental dans le cycle de la matière : passage de l'état minéral à l'état organique, et vice versa. En perpétuelle compétition avec les autres êtres vivants, ils interviennent dans l'équilibre biologique des espèces. De plus en plus de chercheurs se sont ainsi mis à étudier cette biodiversité bactérienne et ont essayé d'élucider ses origines, ses issues et conséquences. L'efficacité de l'étude de la biodiversité réside dans la génération « zéro de perte » ou même une « augmentation positive nette » des applications industrielles bénéfiques pour l'homme et la planète. En effet, via leur machinerie enzymatique très bien adaptée et spécifique, ces bactéries sont capables de transformer des substrats (même des déchets urbains) en des produits moins toxiques ou à haute valeur ajoutée pour la bio-économie. C'est pourquoi beaucoup d'efforts sont déployés pour comprendre cette biodiversité qu'elle soit bactérienne (ou enzymatique) et en tirer des résultats bénéfiques. Ce projet a été entamé dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire pour ensuite réaliser un passage direct au doctorat en automne 2015. Le projet de thèse ainsi que les résultats préliminaires ont été présentés à l'été 2016. Les travaux se divisent en trois projets distincts. Le projet principal consistait à identifier, par une approche rationnelle, la biodiversité des bactéries des boues papetières. Le second volet

de cette thèse a été réalisé lors d'un deuxième projet industriel qui vise à déterminer la biodiversité bactérienne d'un déchet très toxique qui est l'huile usée de moteur et à déterminer le potentiel d'application des souches qui lui sont associées. Finalement, nous avons étudié le potentiel de certaines souches bactériennes isolées de ces deux environnements pour leur capacité de production du bioplastique que ce soit intra ou extra-cellulaire.

## RÉSUMÉ

La microbiologie industrielle représente aujourd'hui un secteur phare des biotechnologies, précisément dans l'innovation, la bio-valorisation et la bio-décontamination des sols. En particulier, les milieux industriels sont connus pour être des incubateurs d'une panoplie de bactéries dotées des machineries enzymatiques nécessaires pour assurer leur adaptation et leur survie dans ce type de milieux. L'objectif de cette thèse était d'isoler et d'identifier des souches bactériennes à partir de deux différents échantillons environnementaux et de les comparer.

En premier lieu, nous avons utilisé les boues papetières et certaines liqueurs papetières de l'industrie de pâtes et papiers Kruger-Wayagamack à Trois-Rivières. Les composés principaux de ces boues sont essentiellement de la cellulose, lignine, xylane et des extraits lipidiques. On peut également retrouver de la lignine dans les liqueurs papetières. Cette lignine peut avoir de nombreuses applications et peut être utilisée comme matière première pour les produits aromatiques substitués à valeur ajoutée. Cependant, une telle utilisation nécessite une dégradation, une décoloration (vu qu'elle est d'origine noir foncé) et un traitement contrôlé de ce composé qui est coûteux finalement pour les industries. Or les enzymes ligninolytiques pourraient constituer une solution efficace pour la dégradation et le traitement de la lignine. Ces deux milieux (liqueurs et boues papetières) ont été utilisés comme source de microorganismes bactériens pour la recherche de nouvelles enzymes hydrolytiques, ligninolytiques et des enzymes de synthèse des polyhydroxyalkanoates (PHA). Donc, dans cette partie du projet, des bactéries de boues ont été isolées de la station de traitement des eaux usées de la papetière Kruger-Wayagamack. Les souches bactériennes ont été criblées pour leurs activités enzymatiques telles que les enzymes hydrolytiques et ligninolytiques. Les bactéries isolées ont également été identifiées morphologiquement et génétiquement. Par la suite, les souches bactériennes ont été testées pour leur capacité à se développer sur les liqueurs noires et vertes de la même usine à papier. Une réduction de la couleur du milieu via la concentration de lignine à l'intérieur des colonies bactériennes a été observée. Pour mieux comprendre ce phénomène, ces bactéries ont été testées sur des colorants semblables à la lignine (avec des structures chimiques semblables). Trois comportements bactériens ont été observés (absorption, adsorption et élimination des colorants et dégradation des colorants) lors du test colorimétrique sur gélose et en milieu liquide. Principalement trois enzymes sont connues pour être responsables de la dégradation de la lignine : la lignine-peroxydase (Lip, EC 1.11.1.14), la manganèse-peroxydase (MnP, EC 1.11.1.13) et la laccase (EC 1.10.3.2). Les meilleurs candidats ont été sélectionnés par la méthode à haut débit de culture liquide afin d'étudier leur capacité de décoloration des colorants. Les résultats ont montré que les bactéries étaient capables de décolorer les colorants azoïques, réactifs, phénoliques et indigoides avec une efficacité élevée.



En deuxième lieu, nous avons étudié un autre type de déchet industriel rarement utilisé dans les études scientifiques: les huiles usées des moteurs. Les huiles usées de moteur sont des déchets extrêmement polluants provenant de la vidange des moteurs d'automobiles. Lorsque rejetée dans le réseau des eaux usées, l'huile usagée colmate les filtres dans les stations de traitement de l'eau et perturbe les processus d'épuration biologique. Ces huiles renferment également des métaux hyper toxiques pour la faune et la flore. Il est alors primordial de continuer la recherche sur des méthodes de traitement ou de valorisation et pourquoi pas, explorer le potentiel d'exploitation qu'offrent ces déchets. Les échantillons environnementaux contaminés par les huiles de moteurs renferment une communauté microbienne diverse possédant les métabolismes les plus performants et les mieux adaptés aux différentes conditions spécifiques imposées par leur milieu. La nature étant bien faite, la solution à la toxicité des huiles usées ou le développement d'applications intéressantes pourrait trouver son origine directement dans les bactéries trouvées dans ces huiles usagées.

C'est ainsi que dans ce second projet, nous visions à exploiter la biodiversité des micro-organismes déjà existant dans une usine de traitement des huiles moteurs usagées et à construire une banque de micro-organismes ayant un potentiel pour la dégradation (bioremédiation) ou dans la valorisation de ce déchet. Pour cela, nous avons prélevé des échantillons à plusieurs sites de l'usine Phoenix Environnement (St-Henri, Québec), un recycleur des huiles usées de moteur. Le criblage des microorganismes a été effectué dans des milieux de culture contenant 10 % d'huile de moteur usagée. Plusieurs dizaines de souches bactériennes ont été sélectionnées, purifiées et caractérisées sur la base de leur capacité à croître et à se développer en présence d'huiles usées de moteur. L'identification génétique via le séquençage de l'ADNr16S ainsi que la caractérisation biochimique de ces microorganismes ont été effectués et des tests de production de bioplastique de type PHA (Polyhydroxyalcanoate) sur milieu ont été réalisés. Cette caractérisation génétique a permis de réaliser une étude bio-informatique sur les gènes responsables de la production du PHA, qui ont par la suite été détectés par PCR. De plus une méthode de détection quantitative de PHAs a été mise au point pour sélectionner les meilleurs producteurs bactériens de ce bioplastique. Outre la capacité de ces bactéries à produire du bioplastique et/ou à dégrader des composés toxiques, nous avons identifié un nouveau consortium bactérien capable de produire un élastomère de type EPDM (identifié par FTIR) dont les applications existantes sont nombreuses.

Pour conclure, cette étude visait à élucider la relation (mono ou multiparamétrique) entre les bactéries et leur environnement en comparant la biodiversité entre les deux niches écologiques choisies (à savoir les huiles usées de moteur et les boues papetières). De plus, nous visions à exploiter leur biodiversité enzymatique pour définir les applications industrielles pertinentes dont on peut citer la production du bioplastique (intra et extracellulaire) et la décoloration des colorants industriels.

**Mots-clés :** enzymes, bactéries, biopolymères, gène de l'ADN 16S, biodiversité.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>iv</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>v</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES .....</b>	<b>xix</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 L'arbre de la vie, les procaryotes et les bactéries .....	1
1.1.1 Les bactéries .....	3
1.2 Bactéries et évolution .....	5
1.2.1 Les mutations bactériennes.....	5
1.2.2 L'ubiquité des bactéries .....	7
1.2.3 Les applications industrielles des bactéries .....	8
1.3 Identification génétique des bactéries via le gène codant pour l'ARNr 16S.....	9
1.3.1 Les avancées dans les techniques de séquençage .....	9
1.3.2 Les gènes ribosomiques et leur utilisation pour l'identification des espèces .....	10
1.3.3 Le gène codant pour l'ARN16S.....	11
1.3.4 Le séquençage d'ADN pour la caractérisation de l'ARN 16S .....	14
1.4 Relation bactéries et environnements .....	15
1.4.1 Théorie 1 : la relation bactérie vs environnement est multi-paramétrique .....	16
1.4.2 Théorie 2 : la relation bactéries VS environnement est mono-paramétrique .....	17
1.5 Les enzymes bactériennes.....	19
1.5.1 Les cellulases .....	20
1.5.2 Les xylanases .....	22

1.5.3	La polyhydroxylakanoate synthase (PHA synthase) ou PHAc .....	24
1.5.4	La lignine peroxidase (LiP) .....	25
1.6	Les applications des bactéries productrices d'enzymes.....	26
1.7	Quand la nature aide la nature .....	28
1.7.1	L'industrie des pâtes et papiers.....	28
1.7.2	Les huiles usées de moteur HUM (ou huiles de vidange d'automobile) .....	30
1.7.3	Valorisation des boues papetières et huiles usées de moteur.....	31
1.8	Les biopolymères bactériens : les enjeux de demain.....	32
1.8.1	Les polyhydroxylcanoates : biopolymères intracellulaires.....	32
1.8.2	Les biopolymères extracellulaires .....	36
1.9	Hypothèses.....	36
1.10	Objectifs.....	37
1.10.1	Objectifs généraux .....	37
1.10.2	Objectifs spécifiques.....	38

## CHAPITRE II

<b>MICROBIAL DIVERSITY IN VARIOUS TYPES OF PAPER MILL SLUDGE: IDENTIFICATION OF ENZYME ACTIVITIES WITH POTENTIAL INDUSTRIAL APPLICATIONS.....</b>	<b>41</b>
2.1 Contribution des auteurs .....	41
2.2 Résumé de l'article (français).....	42
2.3 Article complet (anglais) : Microbial diversity in various types of paper mill sludge: identification of enzyme activities with potential industrial applications.....	43
Abstract.....	43
Background.....	44
Methods .....	46
Paper mill sludge sampling and characteristics .....	46
Isolation and growth of bacteria from sludge samples .....	47
Morphological identification and physiological characterization of the different strains .....	48
Screening of hydrolytic enzyme-producing bacteria .....	48
Detection of ligninolytic enzymes .....	49
Bacteria growth and agar plate decolorization of Kraft pulping liquors.....	50

Bacteria decolorization of lignin-mimicking dyes.....	50
Identification of PHA producing bacteria.....	50
PCR amplification of 16S rRNA gene and sequencing.....	51
Results and discussion.....	51
Identification of bacterial strains from paper mill sludge samples.....	51
Morphological and physiological characterization of strains from paper mill sludge samples.....	54
Hydrolytic activities associated with the bacteria screened from paper mill sludge.....	55
Detection of ligninolytic enzymes.....	58
Decolorization and utilisation of pulping liquors as carbon source by bacteria.....	59
Decolorization of industrial dyes by sludge bacteria.....	62
Bioplastic production by sludge microflora.....	64
Conclusion.....	65
Acknowledgements.....	66
Competing interests.....	66
Rights and permissions.....	66
Open access.....	66
References.....	67
Supplementary materials.....	75

### CHAPITRE III

<b>DEGRADATION OF USED ENGINE OIL ALKANES BY ITS INDIGENOUS BACTERIA, PRODUCTION OF PHA AND SECRETION OF AN ELASTOMER-LIKE BIOPOLYMER.....</b>	<b>80</b>
3.1 Contribution des auteurs.....	80
3.2 Résumé de l'article (français).....	81
3.3 Article complet (anglais) : Degradation of used engine oil alkanes by its indigenous bacteria, production of PHA and secretion of an elastomer-like biopolymer.....	82
Abstract.....	82
Introduction.....	83

Materials and methods .....	85
Used engine oil sampling .....	85
Isolation and growth of bacteria from UEO samples.....	86
Morphological identification and biochemical characterization.....	86
PCR amplification of 16S rRNA gene and sequencing .....	86
Tolerance of bacteria to UEO high concentration .....	87
Chemical analysis of the UEO .....	88
Monitoring degradation of alkanes by FTIR .....	89
Production and analysis of extracellular bacterial biopolymer .....	90
Detection of Polyhydroxyalkanoate (PHA) bacterial production .....	91
Results .....	91
Analysis of UEO .....	91
Morphological and biochemical characterization of bacteria isolated from UEO .....	92
Bacteria identification by analysis of 16S RNA gene sequences .....	93
Bacterial resistance to high concentration of UEO .....	94
PHA detection in bacteria screened from used engine oil .....	95
Degradation of alkanes of used engine oil .....	95
Extracellular biopolymer production and characterisation .....	97
Conclusion .....	99
Acknowledgements.....	100
Competing interests .....	100
References.....	101
Supplementary materials .....	106
<b>CHAPITRE IV</b>	
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>116</b>
4.1 Composition des deux milieux industriels.....	116
4.2 Les boues papetières .....	119
4.3 La biodiversité des huiles usées de moteur.....	120
4.4 La comparaison de la biodiversité .....	122

4.5	Biodiversité des enzymes bactériennes .....	124
4.5.1	Biodiversité des enzymes de l'industrie papetière.....	124
4.5.2	Le cas de <i>Bacillus</i> .....	125
4.6	Biodiversité enzymatique des huiles usées de moteur.....	126
4.7	Comparaison de la biodiversité enzymatique entre les deux échantillons .....	128
4.8	Dégradation des liqueurs papetières .....	128
4.9	Décoloration des colorants industriels (modèles de la lignine).....	130
4.10	Potentiel de production de polymère intracellulaire PHA .....	133
4.11	Dégradation des alcanes .....	137
4.12	Potentiel de production de polymère extracellulaire de type EPDM .....	138
4.12.1	Analyse MS pour identification des enzymes responsables de la production de l'EPDM.....	139
<b>CHAPITRE V</b>		
<b>PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS.....</b>		<b>146</b>
5.1	Perspectives .....	146
5.2	Conclusions .....	147
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>150</b>
<b>ANNEXE A</b>		
<b>LES BOUES PAPETIÈRES .....</b>		<b>168</b>
<b>ANNEXE B</b>		
<b>LES HUILES USÉES DE MOTEUR.....</b>		<b>177</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 L'arbre de la vie simplifié reliant tous les grands groupes des organismes vivants au dernier ancêtre commun, basé sur les séquences d'ARN ribosomiques .....	2
1.2 Anatomie d'une bactérie type .....	3
1.3 Variations et apparitions des mutations pour la conservation de l'espèce .....	7
1.4 Organisation de l'opéron de l'ADNr observée chez les procaryotes démontrant les espaces inter-géniques entre les gènes d'ARN.....	10
1.5 Représentation de la composition du gène 16S en démontrant les régions conservées et variables .....	11
1.6 Principe de méthode de séquençage de l'ADN selon Sanger .....	14
1.7 Étape du séquençage du gène codant pour l'ARN 16S à partir des bactéries...	15
1.8 Relation multiparamétrique bactérie-environnement (Théorie 1).....	17
1.9 Relation mono-paramétrique bactérie-environnement (Théorie 2).....	18
1.10 Schéma d'une réaction enzymatique.....	20
1.11 Structure 3D de l'enzyme cellulase, E.C : 3.2.1.4 .....	21
1.12 Réaction enzymatique de l'hydrolyse de la cellulose via le complexe d'enzyme cellulase (endocellulase, exocellulase et cellobiase) en des sous-unités de glucose.....	22
1.13 Structure 3D de l'enzyme xylanase, E.C : 3.2.1.8 .....	23
1.14 Réaction enzymatique de l'hydrolyse du xylan via une xylanase en des sous-unités de xylose.....	23
1.15 Structure 3D de l'enzyme PHAc, E.C.2.3.1 .....	24
1.16 Réaction enzymatique menant à la polymérisation du PHA via la PHAc .....	24
1.17 Structure 3D de l'enzyme lignine peroxidase LiP EC 1.11.1.14 .....	25

1.18	Réaction enzymatique de dépolymérisation de la lignine via une lignine peroxidase en fragments de lignine .....	26
1.19	Composition d'un granule de PHA .....	34
1.20	Les 3 différentes classes de gènes responsables de la production du PHA .....	35
1.21	Principaux gènes responsables de la production de PHA et les molécules correspondantes produites schématisées en dessous des gènes .....	35
1.22	Schéma des étapes principales sous-jacentes à l'atteinte des objectifs .....	39
4.1	Composition de la fibre de bois montrant la disposition relative des polymères .....	118
4.2	Comparaison de la biodiversité entre les différents types de boues échantillonnées .....	120
4.3	Schématisation de la biodiversité des bactéries isolées des huiles usées de moteur.....	120
4.4	Comparaison de la biodiversité entre les deux échantillons utilisés (à savoir les huiles usées de moteur de Phoenix environnement et les boues papetières de Kruger.....	122
4.5	Activation des molécules alcane nécessite O <sub>2</sub> comme réactif.....	127
4.6	Quantification à haut débit de la décoloration des colorants industriels par le consortium bactérien développé au laboratoire.....	132
4.7	SEM (Microscopie à balayage électronique) des bactéries productrices de PHA ( <i>Bacillus subtilis</i> ) (a) cultivées en conditions de production de PHA versus (b) en conditions de non-production de PHA (milieu Mm).....	135
4.8	Images TEM (Microscopie à transmission microscopique) des granules de PHA intracellulaire dans <i>B. cereus</i> (a) et <i>B. subtilis</i> (b) .....	136
4.9	Biopolymère formé (36 jours) versus polymère en cours de production (20 jours) .....	139
4.10	Analyse des protéines par gel SDS-PAGE réalisé sur les cocultures de <i>Rhodococcus</i> et <i>Stenotrophomonas</i> avant et après formation du biopolymère. ....	140
4.11	Quantité de protéines en pourcentage produites par souches bactériennes.....	141
4.12	Quantité en pourcentage et identification des protéines produites par <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	142



4.13	Schéma explicatif du transporteur membranaire de polymère dans une cellule bactérienne .....	143
4.14	Protéines en pourcentage produites par <i>Rhodococcus sp</i> .....	144
4.15	Comparaison des deux souches ( <i>Rhodococcus</i> et <i>Stenotrophomonas</i> ) au niveau de la production des protéines identifiées par groupe de fonction .....	144
A.1	Zones claires aux alentours des colonies montrant la détection de l'activité enzymatique des souches bactériennes isolées cellulases et de l'activité enzymatique des enzymes cellulases commerciales (C1 à C6) (A4 et B4) sur plaques de gélose supplémentées avec 0,1 % de CMC (A1 à A4) et 0,1 % de PASA (B1 à B4) comme substrat.....	171
A.2	Analyse du type (PHA) de la souche <i>Bacillus cereus</i> après une extraction au chloroforme .....	174
A.3	Structures des types de PHA produits (chaîne courte/moyenne) .....	174
A.4	Décoloration des colorants industriels via les bactéries isolées de la papetière à 37 °C, pH7 après 24 h d'incubation, respectivement : 1 : MB, 2 : PR-478, 3 : CSB, 4 : RBB, 5 : Indigo Carmin .....	175
A.5	Quantification à haut débit de la décoloration des colorants industriels après 20 h d'incubation.....	175
A.6	% de décoloration de MB (bleu de méthylène) des bactéries de la papetière après 24 h de biotraitement, en comparaison avec un control <i>E. coli</i> et la laccase de <i>Tremetes Versicolor</i> en tant que control positif après 20 h .....	176
A.7	Comparaison de l'efficacité de décoloration des 3 bactéries dont deux isolées des boues papetières ( <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Klebsiella pneumonia</i> ) une bactérie contrôle négative <i>E. coli</i> et une enzyme commerciale de type Laccase de <i>Tremates versicolor</i> .....	176
B.1	Bactéries capables de pousser sur Mm supplémenté de 10 % HUM (a, b) et bactéries résistent et poussent sur Mm + 20 % HUM (c) .....	177
B.2	Détection de la fluorescence (spectre d'émission après excitation à différentes longueur d'onde) de différents composés des huiles usées de moteur en présence de <i>Bacillus subtilis</i> après une culture de 7 jours de culture.....	180
B.3	Gel d'électrophorèse de protéines SDS-PAGE.....	181

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Exemples d'enzymes bactériennes et leurs utilisations.....	27
4.1 Différence et similarité entre les deux échantillons industriels étudiés au niveau de leurs compositions et de leurs paramètres physicochimiques .....	117
A.1 Liste des principales enzymes utilisées en industrie .....	168
A.2 Tableau descriptif des bactéries extrêmophiles et leurs applications industrielles .....	169
A.3 Structures et caractéristiques physiques des substrats PASA and CMC cellulose.....	170
A.4 Noms des colorants industriels utilisés pour les tests de décoloration via les bactéries et leur structure chimique relative.....	172
A.5 Décoloration des colorants industriels modèles de lignine utilisés pour cette étude .....	175
B.1 Les activités enzymatiques détectées chez les bactéries isolées des HUM.....	177

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
BLAST	Basic local search tool
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleic acid
dATP	Désoxy-adénine tri-phosphate
dCTP	Désoxy-cytosine tri-phosphate
dGTP	Désoxy-guanine tri-phosphate
dTTP	Désoxy-thymine tri-phosphate
EPDM	Eylene propylene diene monomere
FID	Flame ionization detection
FTIR	Fourier transformation Infra-red
GC	Gas chromatograph
HUM	Huile Usées de Moteur
MS	Masse spectre
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Polyhydroxylaknoate
RNA	Ribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Scanning electron microscopy
EDS	Energy dispersive spectrometry

## LISTE DES SYMBOLES

L	Liter
m	Milli
mg	Milligram
mL	Milliliter
n	Nano
U	Enzyme specific activity unit
$\lambda$	Longueur d'one
$\mu$	Micro
$\mu\text{g}$	Microgram
$\mu\text{L}$	Microliter

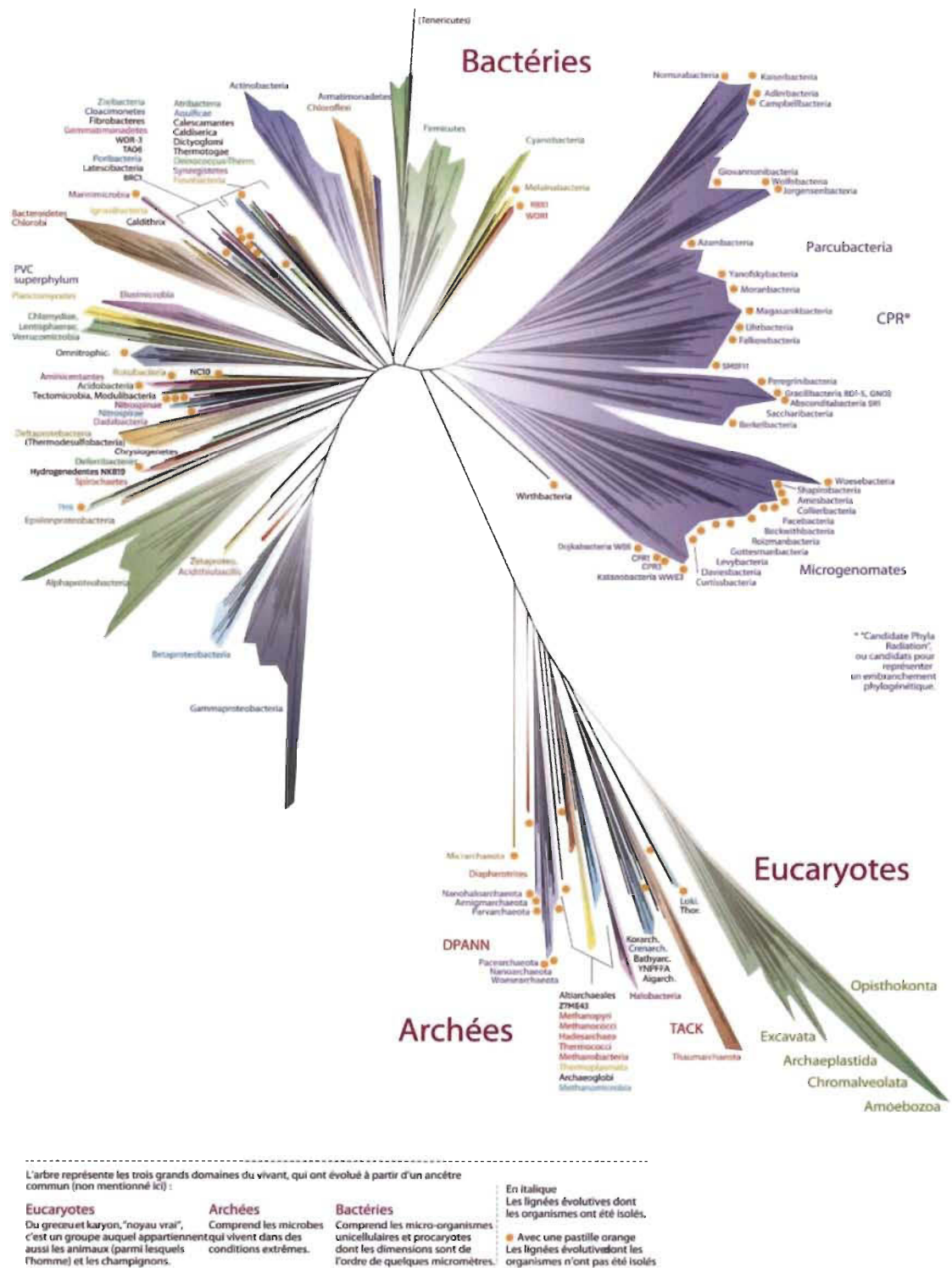
# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 L'arbre de la vie, les procaryotes et les bactéries

En 1859, Charles Darwin a publié l'hypothèse selon laquelle toutes les espèces vivantes sont le fruit de l'évolution et de l'adaptation de leurs ancêtres. Après la publication de cette théorie de l'évolution 1866, le naturaliste allemand Ernst Haeckel a poussé plus loin l'idée de Darwin : il a construit un arbre du vivant avec un tronc symbolisant l'ancêtre commun à tous les organismes vivants, et des ramifications correspondantes aux lignées qui avaient conduit aux organismes modernes (Figure 1.1). À partir de là, les naturalistes, puis les biologistes de l'évolution n'ont cessé de chercher à décrire concrètement la diversité du monde vivant à l'aide d'un tel arbre, en s'appuyant sur les ressemblances entre espèces. Depuis, plus de 2,3 millions d'organismes vivants sont désormais reliés au niveau de l'arbre de la vie. Beaucoup restent encore à recenser. Si l'on prend une classification très simplifiée des espèces, cela donne trois grandes catégories :

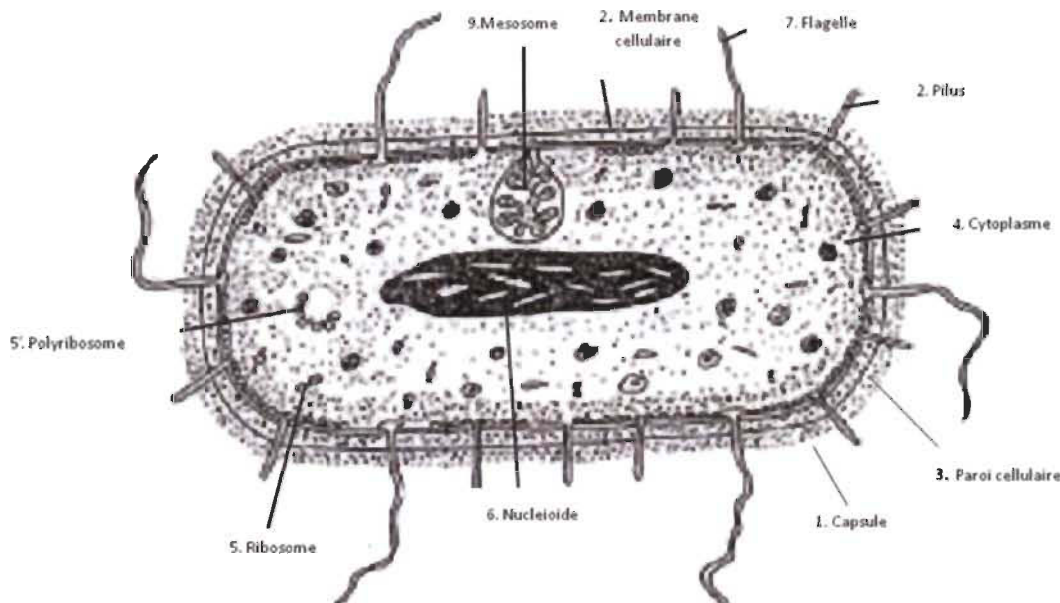
- 1) Les **eucaryotes**, organismes unicellulaires ou multicellulaires, comprennent tous les êtres vivants les plus connus : plantes, champignons et animaux.
- 2) Nous trouvons au milieu les **archées**. Ces microorganismes sont unicellulaires et **procaryotes** (c'est pourquoi ils ont longtemps été confondus avec les bactéries vu qu'ils possèdent leurs formes, mais ils sont biochimiquement plus semblables aux eucaryotes). Ils sont également ubiquitaires (sols, océans, rumens et environnements extrêmes).
- 3) Enfin, nous retrouvons les bactéries, ces organismes microscopiques unicellulaires (elles font elles aussi partie des **procaryotes**) se distinguant comme étant des microorganismes unicellulaires.



### 1.1.1 Les bactéries

Les bactéries sont la forme de vie la plus dominante sur Terre depuis 3 500 millions d'années. Le nombre total des bactéries a été estimé sur Terre à hauteur de 5 millions de trillion ( $5 \times 10^{30}$  de cellules) [1]. Les bactéries constituent également le type cellulaire le plus abondant de la planète. Même notre propre corps contient plus de cellules bactériennes que de cellules humaines [2].

Une bactérie est un microorganisme unicellulaire qui ne possède pas de noyau ni d'autres organites liés à la membrane. Les bactéries sont parfois appelées « procaryotes ». En grec, « procaryote » signifie littéralement « avant la noix » (où « la noix » est le noyau). Les bactéries s'adaptent bien à leur environnement et se présentent donc sous de nombreuses formes assurant cette adaptation. Cependant, ils ont tous quelques points communs dans leur anatomie (Figure 1.2).



**Figure 1.2** Anatomie d'une bactérie type.

Parmi les structures organisationnelles communes à la majorité des bactéries, on retrouve :

- 1) Capsule : une couche protectrice, souvent gluante, contenant souvent des sucres (polysaccharides), qui aide à protéger la bactérie. Ceci rend également les bactéries virulentes. Ce qui signifie que la bactérie devient plus susceptible de provoquer une maladie, car elle aide la cellule à survivre contre les attaques. Par exemple, les bactéries peuvent survivre à une attaque du système immunitaire du corps humain.
- 2) Paroi cellulaire : chez les bactéries, la paroi cellulaire est généralement constituée de peptidoglycane, un composé protéique et sucré. Cette structure donne à la cellule une certaine rigidité et protection contre le stress extracellulaire.
- 3) Membrane cellulaire : comme dans la plupart des cellules, la membrane plasmique de la bactérie agit en coordonnant le passage des molécules à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.
- 4) Cytoplasme : comme dans beaucoup de cellules, le cytoplasme sert de support par lequel les molécules sont transportées, ainsi que de système pour maintenir les conditions (telles que la température et le pH) optimales pour la cellule.
- 5) Ribosomes : machines moléculaires faites d'ARN et de protéines responsables de la synthèse des protéines de la bactérie.
- 6) Nucléoïde : c'est la région où se trouve l'ADN de la bactérie. Contrairement au noyau, il n'est pas entouré d'une membrane.
- 7) Flagellum : c'est un prolongement cytoplasmique. Dans de nombreuses bactéries, un ou plusieurs flagellums est présent et constitue le moyen par lequel la cellule se déplace. C'est une structure assurant la mobilité de la cellule bactérienne.



- 8) Pilus : cet appendice se situe à la surface de la paroi de nombreuses bactéries à Gram négatif (et exceptionnellement des bactéries à Gram positif), plus courts et plus fins que des flagelles, ils ne peuvent pas être impliqués dans la mobilité. On en distingue des pili communs (structures protéiques filamenteuses sur les parois bactériennes) et des pili sexuels (en nombre très restreint, pas plus que trois et sont codés par le plasmide F ayant un rôle essentiel dans la conjugaison bactérienne).
- 9) Mésosome : ce sont des invaginations de la membrane plasmique en forme de vésicule, de tube ou de lamelle. Plusieurs théories controverses discutent de son rôle encore malcompris. Les mésosomes sont plus souvent observées chez les bactéries Gram+.

Les organismes supérieurs, dont l'Homme, sont colonisés par ces bactéries que ce soit du niveau du macroenvironnement (maison, jardin, air...) ou au niveau de leur microenvironnement (leur corps en tant que tel). Ces relations sont parfois bénéfiques aux deux partenaires. Certaines de ces bactéries sont indispensables à l'Homme en particulier pour sa digestion et la production de vitamines [3]. On parle ici du microbiote intestinal. Alors que d'autres bactéries lui sont pathogènes par exemple *Streptococcus pneumoniae* qui cause des maladies allant d'une simple infection de l'oreille ou des sinus à une pneumonie ou une infection de la circulation sanguine [4].

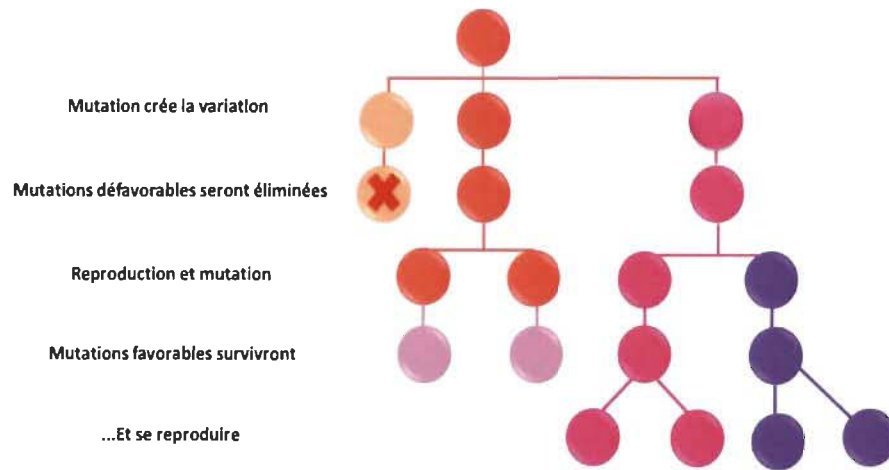
## **1.2 Bactéries et évolution**

### **1.2.1 Les mutations bactériennes**

Le nombre élevé des bactéries se traduit en une grande diversité de la vie microbienne. La pluralité bactérienne est le principal réservoir restant de la diversité biologique inconnue sur la Terre. Cette diversité provient d'une évolution et des mutations au cours du temps de ces bactéries entre autres.

La caractérisation d'un organisme n'est plus limitée par des barrières méthodologiques et il est maintenant possible de séquencer complètement le génome d'une souche afin d'étudier des gènes individuels, ou d'examiner l'information génétique et les mutations à l'aide de différentes techniques. Ces méthodes sont sous-jacentes à une nouvelle discipline scientifique connue sous le nom de la génomique. En fait, l'application de la génomique permet non seulement de mieux comprendre les limites des genres et les niveaux de classification supérieurs, mais également d'affiner notre définition du concept d'espèce. En outre, une meilleure compréhension de la génomique nous permet de prédire le potentiel génétique des microorganismes pour des applications biotechnologiques et leur adaptation aux changements environnementaux.

Les bactéries, connues comme étant l'organisme le plus abondant sur terre, ont également suivi la théorie darwinienne de l'évolution pour assurer leur survie et s'adapter à la variation des environnements. En effet, la diversité génétique bactérienne se modélisant dans de différents genres et espèces a pour origine des modifications de l'information génétique dans l'ADN de la cellule bactérienne. Il s'agit premièrement de mutations ponctuelles dans la séquence d'ADN des gènes; et deuxièmement, de recombinaisons génétiques qui se produisent lors des transferts d'ADN des bactéries. On peut ajouter aux modifications du génome une autre source de diversité génétique, soit les migrations par lesquelles le stock génétique dans une population donnée se voit renouvelé par l'arrivée d'autres membres de l'espèce porteuse d'un ensemble génétique différent ou par l'influence de l'environnement dans lequel se retrouvent ces microorganismes. Ces dernières variations se distinguent par le fait que suite aux mutations quelques rares bactéries au sein de la population d'une même génération sont modifiées pour un caractère leur conférant une meilleure adaptation aux conditions du milieu, selon une fréquence statistiquement mesurable (taux de mutation), alors que dans la variation phénotypique toutes les cellules de la population bactérienne sont concernées par la modification physiologique (dans un éventail de variations autorisées par leur génotype). De plus, les caractères exprimés par les mutants sont généralement stables et héréditaires (Figure 1.3).



**Figure 1.3** Variations et apparitions des mutations pour la conservation de l'espèce.

Certaines de ces mutations sont bénéfiques aux microorganismes et leur permettent de mieux s'adapter et coloniser différents environnements. Ce qui explique que les microorganismes, surtout de type bactérien, existent partout et constituent un des groupes les plus abondants et les plus riches en espèces. Elles sont responsables également de plusieurs processus écosystémiques critiques. Malgré leur importance écologique par le passé, des contraintes pratiques et théoriques de la biologie moléculaire ont limité notre capacité à documenter les schémas de cette diversité bactérienne très importante et à comprendre les processus qui déterminent ces modèles. Cependant, les progrès récents des techniques moléculaires rendent possible une étude plus approfondie des bactéries dans la nature et ont permis de mieux examiner de tels modèles et processus.

### 1.2.2 L'ubiquité des bactéries

Il est aussi à noter que les bactéries se retrouvent dans tous les environnements qui nous entourent (c'est l'une de leurs particularités écologiques les plus frappantes). Cette caractéristique d'omniprésence ou d'ubiquité fait que ces microorganismes se rassemblent dans les milieux les plus simples ou dans les milieux les plus complexes (ce qu'on nommera « extrêmes » par la suite dans cette thèse). Dans les sols notamment, on peut retrouver des bactéries de type *Agrobacterium*; *Dechloromonas*; *Rhodocyclus*; *Azoarcus*; *Pseudomonas*; *Escherichia*; *Bacillus*; *Stigmatella*; *Geobacter*; *Marinobacter*; *Agrobacterium*; *Azoarcus*; etc. [5] [6]. Dans l'air, on retrouve une multitude de bactéries

associées par exemple au genre *Staphylococcus*; *Pseudomonas*; *Bacillus*; *Micrococcus*; etc [7] alors que dans les milieux marins on retrouve des bactéries généralement identifiées aux *Actinobacteries* (*Streptomyces* et *Salinispora*) [8].

### **1.2.2.1 Les bactéries extrémophiles**

Ce qui est encore fascinant dans le monde microbien, c'est cette capacité bactérienne à s'adapter pour coloniser différents milieux même pauvres en nutriments et ressources. En effet, ces bactéries existent dans différents milieux, même dans les environnements les plus extrêmes d'où la dénomination d'extrémophiles (ce titre s'applique aux bactéries provenant des sites aux températures très élevées proches de 100 °C, vivant proches des volcans ou dans le désert (hyper thermophiles) ou à des très basses températures proches de 0 °C (psychrophiles) par exemple dans les montagnes de l'Alaska [9]). On peut retrouver également certains extrémophiles vivant à des pressions exceptionnelles qu'on décrit dans la littérature comme barophiles et qui se retrouvent généralement dans de grands fonds marins [9] [10]. En ce qui concerne un autre type de bactéries vivant dans les milieux à haute salinité, on parle de bactéries halophiles qui s'accommodent ou ont besoin de fortes concentrations en sel dans leur milieu pour vivre. Les acidophiles sont les bactéries préférant les milieux très acides alors que les alcalophiles ont un optimum de développement et de croissance dans les milieux très alcalins (exemple : *Bacillus alcalophilus*), dans les milieux radioactifs ou anoxiques (sans oxygène) ou non-éclairés, on retrouve les dites endolithes cyanobactéries comme *Chroococcidiopsis* [11].

### **1.2.3 Les applications industrielles des bactéries**

Grâce à leur capacité d'adaptation due à l'évolution, beaucoup de bactéries sont bénéfiques à l'homme et à sa santé. On les utilise également dans notre vie quotidienne pour différentes applications industrielles. On peut parler ici à titre d'exemple de la bactérie la plus utilisée dans l'industrie agroalimentaire : la bactérie aigüe du lait, *Lactobacillus bulgaricus*, qui joue un rôle phare dans la fabrication du yaourt et du fromage. D'autres bactéries sont aussi utilisées pour former des acides organiques dans

les marinades et le vinaigre, tandis que des composés organiques, tels que l'acétone, l'isopropanol et l'acide butyrique, sont produits en fermentation par diverses espèces de *Clostridium* et sont exploités à l'échelle industrielle.

D'autres produits et réactions bactériennes ont été découverts chez des micro-organismes provenant d'environnements extrêmes. Il existe un intérêt considérable pour les enzymes isolées à partir de bactéries thermophiles, pour lesquelles les réactions peuvent être conduites à des vitesses plus élevées en raison des températures plus élevées auxquelles elles peuvent se produire, comme certaines lipases [12]. D'autres bactéries sont utilisées comme des probiotiques dans certains cas pour l'homme afin de fortifier et améliorer la digestion, impliquant certaines bactéries produisant des protéases [13]. Pour cette application, on peut parler par exemple des souches de probiotiques les plus connues, les plus étudiées et dont l'efficacité a été prouvée : les lactobacilles dont le *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus plantarum*, et les bifidobactéries (genre *Bifidobacterium* : comme *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium bifidum*).

Par conséquent à ces applications bactériennes bénéfiques pour l'homme, il est ainsi fascinant d'élaborer une relation entre les branches de l'arbre phylogénétique démontrant que ce règne de prokaryote pourrait bien être au service des êtres humains.

### **1.3 Identification génétique des bactéries via le gène codant pour l'ARNr 16S**

#### **1.3.1 Les avancées dans les techniques de séquençage**

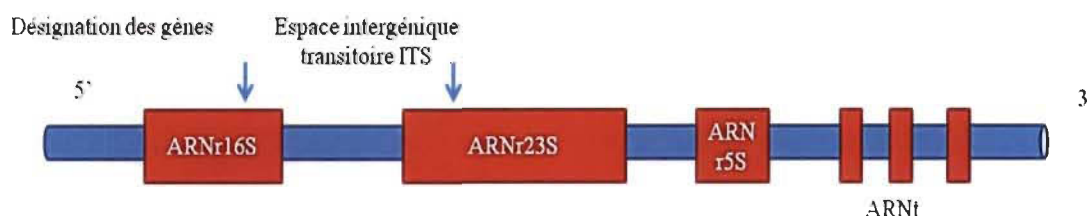
Étant donné la complexité du règne des procaryotes, il est très important de bien identifier génétiquement ces bactéries et les taxons auxquels elles appartiennent. Afin d'identifier les différentes bactéries, on peut soit séquencer le génome ou séquencer seulement des marqueurs génétiques qui renferment des informations concernant l'espèce. Pour ce faire sont apparues les premières techniques de séquençage dans la deuxième moitié des années 1970 et qui ont constamment évoluées depuis. La méthode de référence

pour caractériser génétiquement une bactérie (bien que discutable et discutée) reste le séquençage de l'ADN « la méthode Gold standard ». Cette technique est réputée pour être la plus fiable, la plus précise et la plus reproductible. Le séquençage de l'ADN s'est beaucoup amélioré depuis que de nouvelles générations de séquençages basées sur des méthodes et des techniques évoluées d'identification des bases sont apparues. Ainsi, le séquençage « à haut débit » est devenu un outil tellement simple et abordable qu'il est devenu une pratique courante dans les laboratoires de microbiologie.

### 1.3.2 Les gènes ribosomiques et leur utilisation pour l'identification des espèces

Différents gènes ribosomiques sont utilisés comme marqueurs moléculaires dans l'étude phylogénétique de différents organismes en raison de leur universalité, leur abondance et leur taille convenable aux analyses comparatives [14]. Les ADNr contiennent des régions de séquences hautement conservées, très utiles pour la désignation des amorces [15] [16] et d'autres régions de séquences suffisamment variables pour servir comme un excellent moyen taxonomique [17].

Chez les procaryotes particulièrement, les gènes codant pour les ARN ribosomaux sont organisés en opérons qui contiennent également des espaces inter-géniques ainsi que d'autres gènes codant pour les ARN de transfert (ARNt) (Figure 1.4).



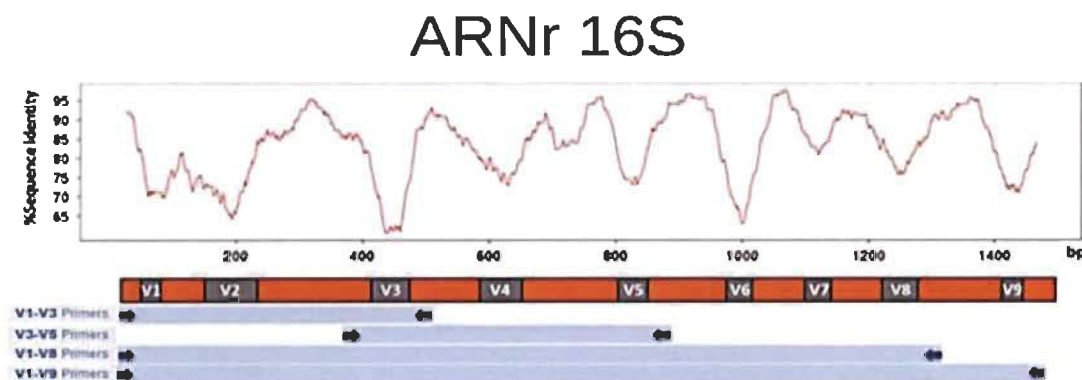
**Figure 1.4** Organisation de l'opéron de l'ADNr observée chez les procaryotes démontrant les espaces inter-géniques entre les gènes d'ARN [18].

Comme le montre la figure précédente, il existe trois types d'ARN ribosomique : le 5S, le 16S et le 23S [19]. Ces ARNr sont codées par leur ADNr correspondant. L'ADNr 5S est très peu utilisé dans les études de diversité vu sa petite taille d'environ

120 nucléotides. Contrairement à ce dernier, l'ADNr 16S (codant pour la petite sous-unité ribosomique d'environ 1500 pb (opéron *rrs* : *ribosomal RNA small subunit*)) et l'ADNr 23S (codant pour la grande sous-unité d'environ 2500 à 3000 pb (opéron *rrl* : *ribosomal RNA large subunit*)) [20] sont très utilisés. L'espace entre ces deux opérons est transcriptionnel d'où la désignation ITS (*Internal Transcribed Spacer*) [21]. Dans cette thèse nous avons utilisé l'ADNr 16S pour l'identification génétique des bactéries isolées.

### 1.3.3 Le gène codant pour l'ARN16S

Depuis que Woese (1987) [22] a montré que le gène de l'ADNr 16S est présent chez toutes les bactéries, qu'il a la même fonction et que sa structure est conservée, plusieurs chercheurs l'ont préférentiellement utilisé comme cible pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de *Rhizobia* [23] [24] et l'ont également qualifié d'«horloge moléculaire» pour mesurer les distances phylogénétiques entre les différentes espèces bactériennes [25]. En effet ce gène est universellement retrouvé chez les bactéries et sa fonction est conservée. Le choix de l'ARN 16S plutôt que 23S ou 5S est d'ordre technique (taille du gène, information disponible) et dépend aussi du nombre élevé de telles séquences dans les banques de données. La figure suivante (Figure 1.5) schématise la composition du gène 16S qui se divise en régions conservées et variables :



**Figure 1.5** Représentation de la composition du gène 16S en démontrant les régions conservées et variables.

La position des amorces ici est indiquée en bleu pour certaines régions conservées du gène. En bas du graphique figurent les différents couples d'amorces utilisables pour son séquençage [26].



L'ARN 16S est un ARN non codant qui possède des régions conservées et des régions variables (Vn) (colorées respectivement en orange et en gris dans la Figure 1.5). Les régions conservées sont les régions qu'on peut utiliser pour construire des amorces pour une PCR afin de sélectionner la région d'intérêt et/ou de capturer l'ensemble du gène codant pour l'ARN 16S. Pour les régions variables, on n'a pas encore détecté de rôle fonctionnel important. Ces dernières peuvent diverger au cours de l'évolution sous l'effet des mutations neutres. Elles vont ainsi permettre de discriminer des taxons bactériens.

Notons que l'opéron ribosomique est présent en un nombre de copies variables selon les génomes, pouvant aller de 1 à 15 copies selon l'espèce bactérienne [27]. Maintes copies peuvent être différentes. Ceci peut rendre plus complexe l'identification de ces organismes en utilisant une approche métagénomique. Ainsi, la variation du nombre de copies du locus cible entre génomes provoque une estimation biaisée de la diversité microbienne. Ce qui nous amène vers les principaux inconvénients reliés à l'utilisation de cette technique. En effet, il n'est pas facile d'en obtenir une quantification bactérienne, car les gènes codant l'ARNr peuvent être présents en plusieurs copies, le nombre de copies variant en fonction de la taille du génome et de la vitesse de croissance de la bactérie. Pour quantifier les bactéries, d'autres gènes sont utilisés, présents en même nombre de copies chez toutes les bactéries (une copie généralement).

Il existe des gènes procaryotes présents en même nombre de copies chez toutes les bactéries (une copie généralement), on parle ici des gènes ubiquitaires (gène de ménage ou housekeeping genes). Ce sont des gènes constants, indispensables à la vie de toutes les cellules. Certains existent en un seul exemplaire chez pratiquement tous ces microorganismes et présentent une grande diversité intra-spécifique. Cette caractéristique a fait que ces gènes sont considérés comme un outil de choix dans les expériences de typage moléculaire (Multi-Locus Sequence Typing : MLST) [28]. Ils permettent d'obtenir un résultat rapide, précis et fiable dans l'identification des souches très proches. Ceci présente une grande importance dans le domaine thérapeutique (identification des souches pathogène appartenant à la même espèce) [28]. Les gènes de ménage sont généralement de petite taille quoique celle-ci est très variable, notamment d'une espèce à une autre. Par exemple, pour le *pdhC* (codant pour le pyruvate déshydrogénase), alors que la taille de



celui-ci est de 1239 paire de base (pb) au sein de *Staphylococcus aureus* [29] et de 1329 pb chez *Bacillus subtilis* [30], elle n'est que de 480 pb chez *Neisseria meningitis* [28].

Comme gène de ménage on peut parler également de la sous-unité Béta (B) de l'ADN gyrase (gyrB) : Le gyrB est un gène qui code pour la protéine de la sous-unité B de l'ADN gyrase (ou la topoisomerase II). C'est un enzyme qui est responsable de la présence des supercoils négatifs dans les chromosomes bactériens et qui joue un rôle crucial dans leur réplication [31]. La sous-unité B de l'ADN gyrase est essentielle pour la survie des cellules bactériennes. Le transfert horizontal de ce gène est rare ce qui explique son utilisation dans la classification taxonomique des bactéries [32] [33] [34] [35].

Ils existent aussi d'autre gène de ménage comme la Rpo (A, B, C), Rpo est pour RNA polymérase de la sous-unité Béta. C'est un housekeeping gene permettant le typage moléculaire qui a un pouvoir discriminatoire plus élevé que le 16S ainsi qu'une variabilité inter espèce élevée. La séquence du fragment rpoB est localisé entre les positions 2300 et 3300pb et est très utile pour la description des nouvelles espèces bactériennes.

Les Rec (pour recombinaison) aussi sont considérés comme des housekeeping gene faisant l'objet d'un intérêt élevé pour la détermination de la variabilité inter espèces.

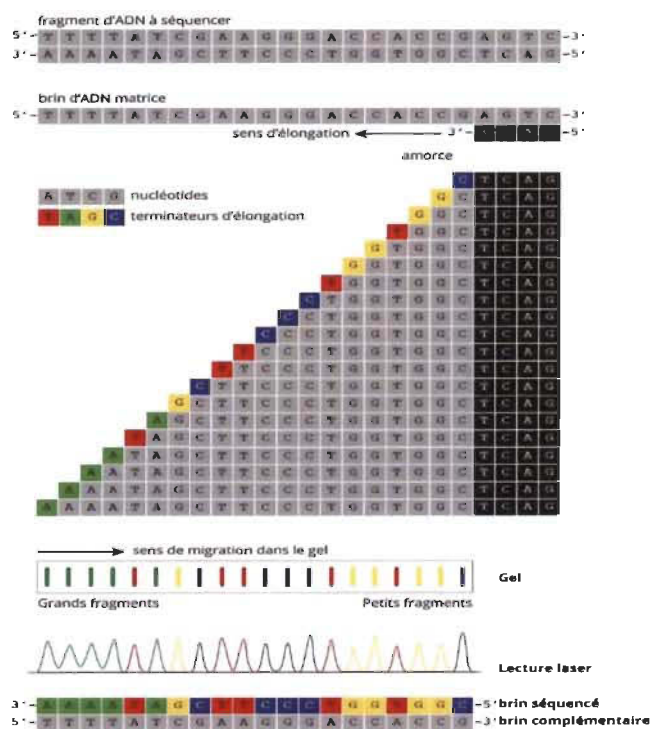
Il existe aussi des gènes qui peuvent apparaître à une copie unique dans le génome de certaines bactéries. On peut citer par exemple le gène de la sous-unité alpha du méthyle, coenzyme M reductase (mcrA) dans la bactérie *Methanococcus maripaludis* et un autre gène codant pour la sous-unité alpha de l'adenosine5'-phosphosulfate kinase (apsA) dans les bactéries sulfate-réductase bacterium *Desulfobulbus propionicus*.

Il y a un autre inconvénient relié à l'ADN codant pour l'ARNr 16S, c'est que son séquençage a un faible pouvoir résolutif à l'espèce pour certains genres bactériens : ainsi, ne peuvent être distingués *Neisseria cinerea* et *N. meningitidis*, ou *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* et *S. oralis* ou encore le groupe des *Campylobacter* non *jejuni* non *coli*. Une autre faiblesse de cette approche implique ainsi l'étude de la relation gène

et phénotype relatif. De plus, des séquences ambiguës ont été déposées dans certaines banques de données publiques par le passé, ce qui peut conduire à des erreurs d'identification. Certaines espèces présentent > 99,5 % de similarité entre elles, mais des différences phénotypiques sont très claires (ex. : 3 espèces d'*Edwardsiella*). D'où encore une fois, l'intérêt d'étudier les gènes de ménages mentionnés plutôt dans ce paragraphe.

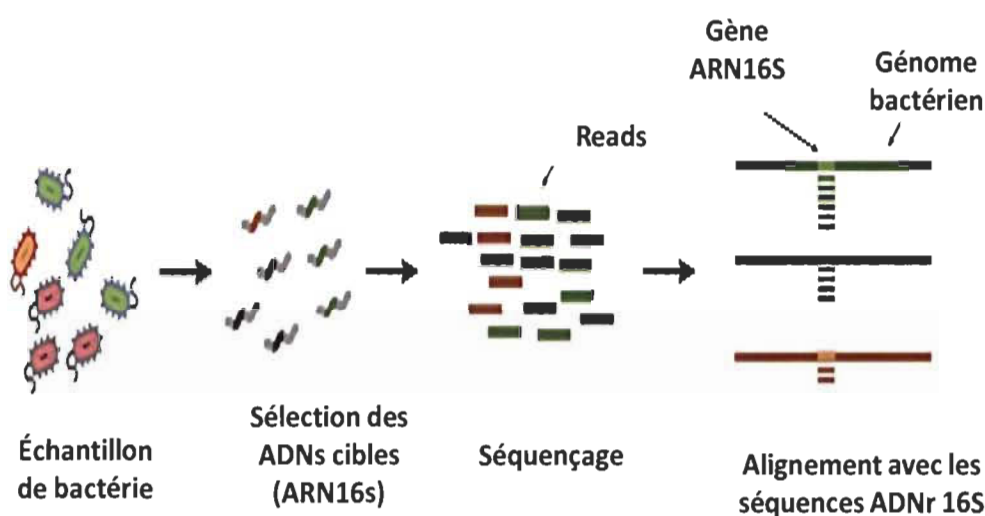
### 1.3.4 Le séquençage d'ADN pour la caractérisation de l'ARN 16S

Le séquençage de l'ADN est possible depuis quelques décennies grâce à l'amélioration des travaux de Sanger [36]. Le séquençage Sanger est une méthode de séquençage de l'ADN basée sur l'incorporation sélective de di-désoxynucléotides à terminaison de chaîne par l'ADN polymérase lors de la réplification d'ADN *in vitro* (Figure 1.6). Cette méthode est à la base de l'évolution des techniques de séquençage avancées, qui permettent aujourd'hui d'accélérer l'étude de la biodiversité bactérienne à travers le monde. Cette technique de séquençage (Figure 1.7) permet de couvrir toutes les régions hypervariables (dont il existe 9 sur le gène 16S).



**Figure 1.6** Principe de méthode de séquençage de l'ADN selon Sanger [37].

Avec la multiplication des recherches dans ce domaine, il appert que le choix de la région à séquencer repose sur différentes considérations. Certains préfèrent séquencer les régions V2-V3, tel est le cas de [38], d'autres préfèrent étudier les séquences des régions conservées entre V4-V6 [39]. Dans d'autres cas, la répétition a démontré des meilleurs résultats pour certaines régions si l'échantillon est issu d'un certain milieu naturel. Par exemple dans le cas de l'étude du microbiote de certains échantillons environnementaux, on s'intéresse aux régions d'intérêt comme V1-V2 pour les études des eaux usées [40] alors qu'on préfère la région entre V3-V4 pour le microbiote intestinal humain [41].



**Figure 1.7** Étape du séquençage du gène codant pour l'ARN 16S à partir des bactéries [26].

#### 1.4 Relation bactéries et environnements

En utilisant une compilation à l'échelle mondiale de données microbiennes retrouvées par séquençage, plusieurs recherches ont démontré que les modifications discutées ci-haut permettent l'adaptation du microorganisme (la bactérie) à son environnement et assurent également sa multiplication et sa survie en s'ajustant à son milieu naturel. C'est en effet en adaptant leurs mécanismes génétiques et enzymatiques, que ces bactéries s'acclimatent à leur surface de vie [42].

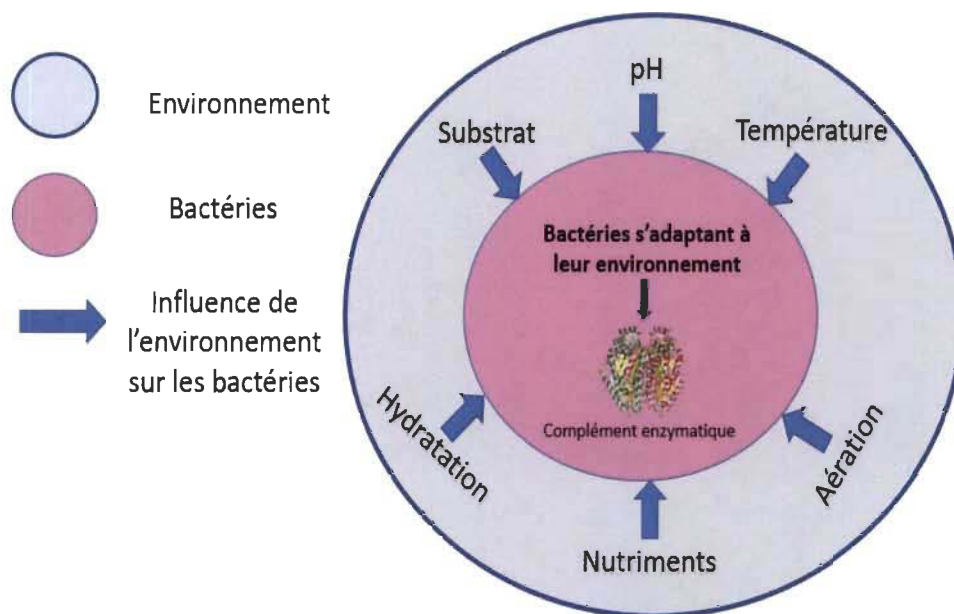
Il est à noter que la relation bactérie avec son milieu naturel demande encore plus d'études approfondies, mais il existe deux théories pour l'adaptation à l'environnement :

- La théorie de la **relation multiparamétrique** démontrant que les différents composants du milieu naturel de la bactérie sont impliqués dans la définition (à savoir la composition) de la machinerie enzymatique bactérienne. On peut citer par exemple les travaux réalisés par Mayo [43] et ses collègues. Dans cette recherche, on démontre que la biodiversité d'un milieu environnemental est dépendante de tous les paramètres qui lui sont infligés.
- La théorie de la **relation mono-paramétrique** dictant que le complément enzymatique bactérien est dûment dépendant d'un paramètre référentiel qui, dans la majorité des cas, est la disponibilité du substrat dans l'environnement bactérien [44].

#### **1.4.1 Théorie 1 : la relation bactérie vs environnement est multiparamétrique**

Bien que la complexité de l'environnement soit reconnue depuis longtemps comme un élément majeur des processus d'évolution, elle n'a été intégrée que récemment dans les enquêtes sur le fonctionnement de la biodiversité et des écosystèmes. La complexité environnementale devrait renforcer l'effet positif de la richesse en espèces sur le fonctionnement des écosystèmes, principalement parce qu'elle entraîne des effets de complémentarité plus importants, tels que la répartition des ressources et les interactions facilitantes entre espèces lorsque le nombre de ressources disponibles augmente [45] [46].

Les conditions qui prévalent (substrats, température, pH, hydratation ou autre) peuvent affecter le comportement et la compétitivité des espèces (Figure 1.8). La complexité de l'environnement sous la forme de ressources multiples peut soutenir une plus grande biodiversité en réduisant la compétition interspécifique grâce à une plus grande différenciation de l'utilisation des ressources entre les espèces [47]. Cependant, les effets interactifs de la complexité de l'environnement et de la diversité des espèces sur le fonctionnement des écosystèmes n'ont été examinés que récemment.

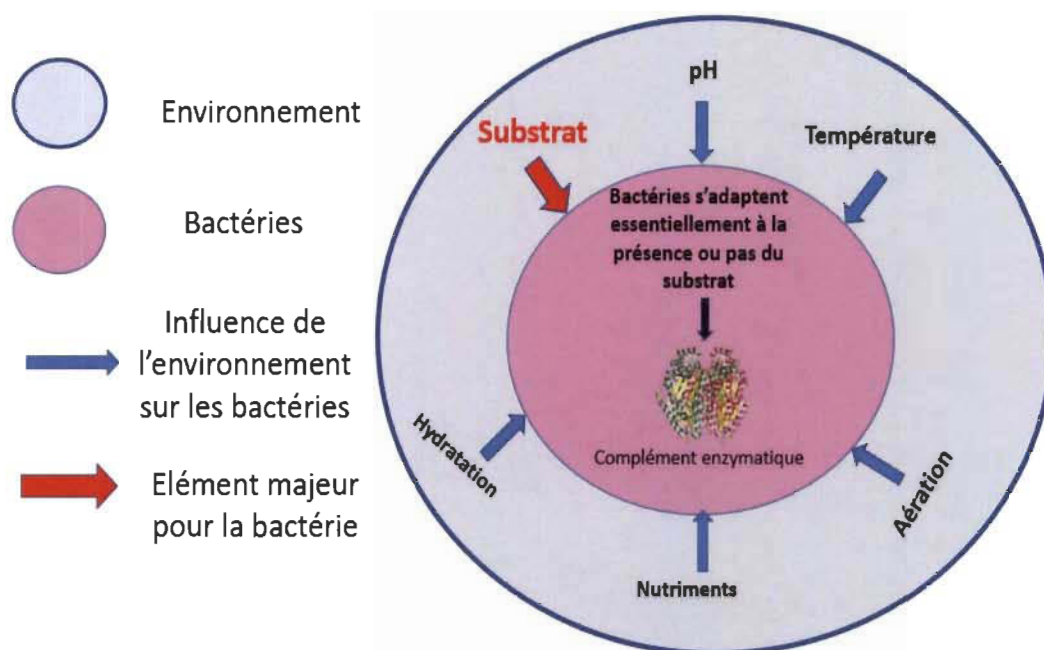


**Figure 1.8** Relation multiparamétrique bactérie-environnement (Théorie 1).

#### 1.4.2 Théorie 2 : la relation bactéries VS environnement est mono-paramétrique

Il existe de plus en plus de preuves d'une relation directe entre la composition du milieu et la fonction d'une communauté microbienne, ce qui implique que les propriétés fonctionnelles des communautés microbiennes distinctes varient selon la nature du substrat disponible dans le milieu.

En effet, le type bactérien présent peut différer selon la nature du substrat disponible dans l'environnement. Par exemple, l'effet de la présence de différentes sources de carbone dans le milieu favorise la croissance d'une souche bactérienne par rapport à une autre. Ceci peut se produire selon la capacité d'assimilation de ces sources carboniques par les bactéries [48]. La machinerie enzymatique bactérienne peut ainsi être différente. La diversité des enzymes sollicitées dans un milieu riche en un substrat précis par rapport à un autre peut être un indicateur démontrant une carence dans un substrat dans l'environnement bactérien [49]. Cette relation mono-paramétrique est ainsi totalement indépendante des autres facteurs par exemple la température et le pH du milieu (Figure 1.9).



**Figure 1.9** Relation mono-paramétrique bactérie-environnement (Théorie 2). On prend dans cette figure comme exemple le substrat.

Compte tenu de la grande diversité des composés riches en carbone (C) retrouvés dans les sols, la capacité de chaque taxon à ne concurrencer que pour un sous-ensemble de ressources pourrait également contribuer à la grande diversité des bactéries dans les sols grâce au cloisonnement des ressources [42]. En effet, Waldrop et Firestone [43] ont montré des préférences distinctes en matière de substrat pour de grands groupes microbiens dans les sols. Par la suite d'autres études ont démontré que la partition des ressources en carbone contribuait de manière décisive aux modèles de coexistence bactérienne dans les communautés à la surface des sols et proches des plantes [44]. Malheureusement, cette théorie n'a pas été vérifiée de manière complète, principalement en raison des limites méthodologiques rencontrées pour échantillonner l'énorme diversité et pour mesurer les réponses fonctionnelles. Dans cette thèse, nous allons essayer d'élucider entre autres la relation bactérie et son environnement (source de carbones, pH et température). Nous allons tenter d'élucider laquelle des deux théories est appliquée aux populations bactériennes dans les échantillons environnementaux choisis dans cette étude.



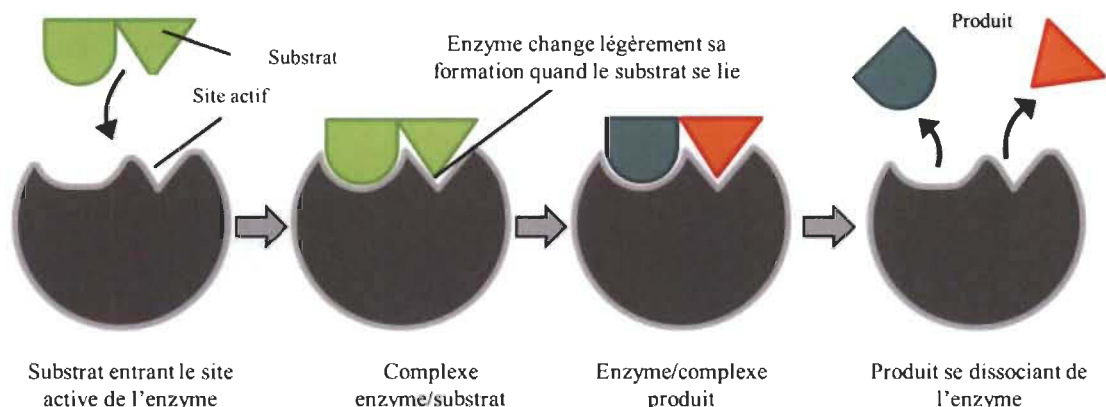
Alors, mise à part l'étude des différentes façons de connecter la dominance de certains genres bactériens avec les éléments du milieu environnemental dans lequel elles se retrouvent, on s'intéresse également lors de cette thèse au rôle et au fonctionnement de ces bactéries quand elles sont en contact avec leurs environnements (ou des substrats représentatifs de leurs milieux). Cet ajustement de la machinerie enzymatique avec les conditions du milieu est aussi une forme d'adaptation phénotypique de la bactérie à son environnement. Ceci nous amène, dans cette deuxième partie de l'introduction, à discuter des rôles des bactéries au niveau de la protection et de la sauvegarde de l'environnement en s'intéressant au fonctionnement et au rôle des enzymes via lesquelles les bactéries sont capables de lutter et de se développer dans certains milieux.

## **1.5 Les enzymes bactériennes**

Dans le monde vivant, chaque réaction chimique est catalysée par sa propre enzyme. Les enzymes présentent une grande spécificité, car elles sont capables de discriminer des molécules de substrat même légèrement différentes. Les enzymes sont définies comme étant des protéines appelées catalyseurs biologiques en raison de leur capacité à rendre les réactions plus rapides et plus efficaces. Elles se lient à un substrat de manière très spécifique par une région appelée site actif où les acides aminés de l'enzyme auront une spécificité élevée pour un substrat. C'est ainsi que s'induit la formation du complexe enzyme-substrat et ensuite, l'enzyme favorise une réaction, par exemple une hydrolyse du substrat par l'enzyme, ce qui entraîne la libération du produit. Après la réaction, l'enzyme revient à son état d'origine (Figure 1.10).

Historiquement, la sélection des microorganismes produisant des enzymes a été empirique en partant des échantillons de sources naturelles très diverses. Des cultures enrichies par croissance sur des substrats ont été utilisées pour inoculer des fermentations. Plus tard, des souches bactériennes pures ont été sélectionnées [50], et la taxonomie de ces souches bactériennes est devenue un élément clé du développement des enzymes industrielles. Depuis lors, la séquence de l'ARNr 16S a été systématiquement déterminée pour chaque souche bactérienne produisant une enzyme aux propriétés intéressantes [51]

[52] [53]. En effet, ces enzymes pourraient être produites à la fois par la bactérie hôte originale et par des hôtes d'expression spécialisés. Parmi les enzymes sur lesquels nous allons nous concentrer dans cette recherche, on va en présenter certaines dans les sections suivantes.



**Figure 1.10** Schéma d'une réaction enzymatique. Adapté de [54].

### 1.5.1 Les cellulases

La cellulase désigne une famille d'enzymes qui agissent de concert pour hydrolyser la cellulose (Figure 1.11). Les cellulases sont largement répandues dans la biosphère et se manifestent surtout dans les organismes fongiques et microbiens. La cellulase est un complexe enzymatique qui décompose la cellulose en bêta-glucose.

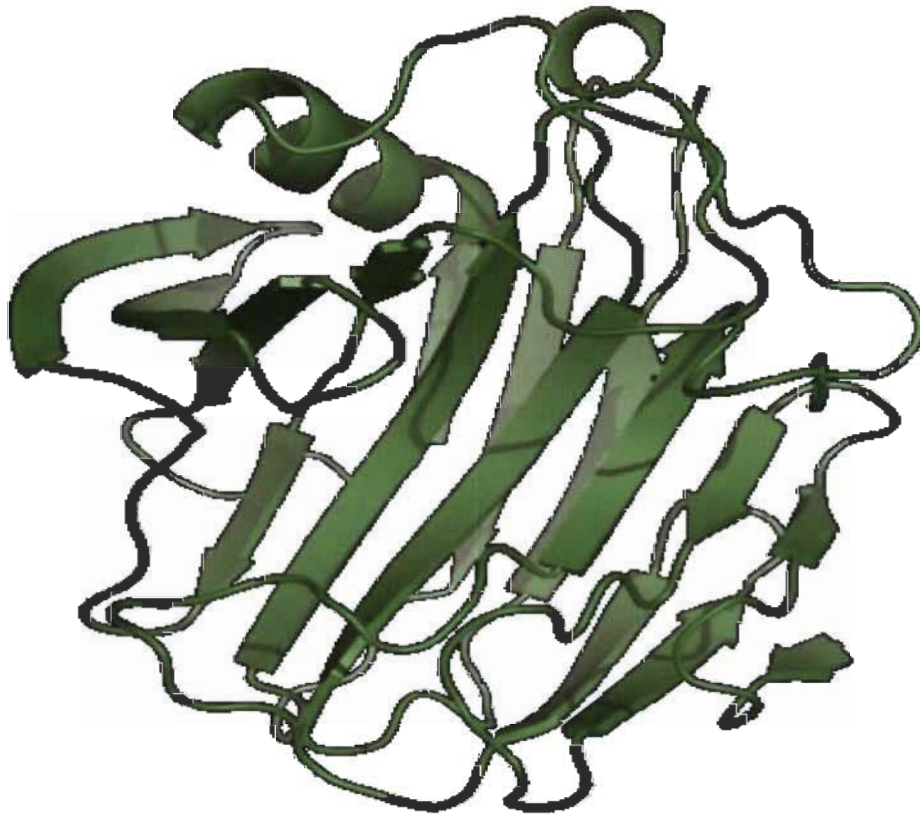
Trois types d'activités enzymatiques peuvent être associées aux cellulases.

- L'endocellulase rompt les liaisons internes pour perturber la structure cristalline de la cellulose et exposer des chaînes individuelles de polysaccharide de cellulase.
- L'exocellulase clive 2 à 4 unités des extrémités des chaînes exposées produites par l'endocellulase, ce qui donne les tétrasaccharides ou les disaccharides tels que le cellobiose (Figure 1.12).

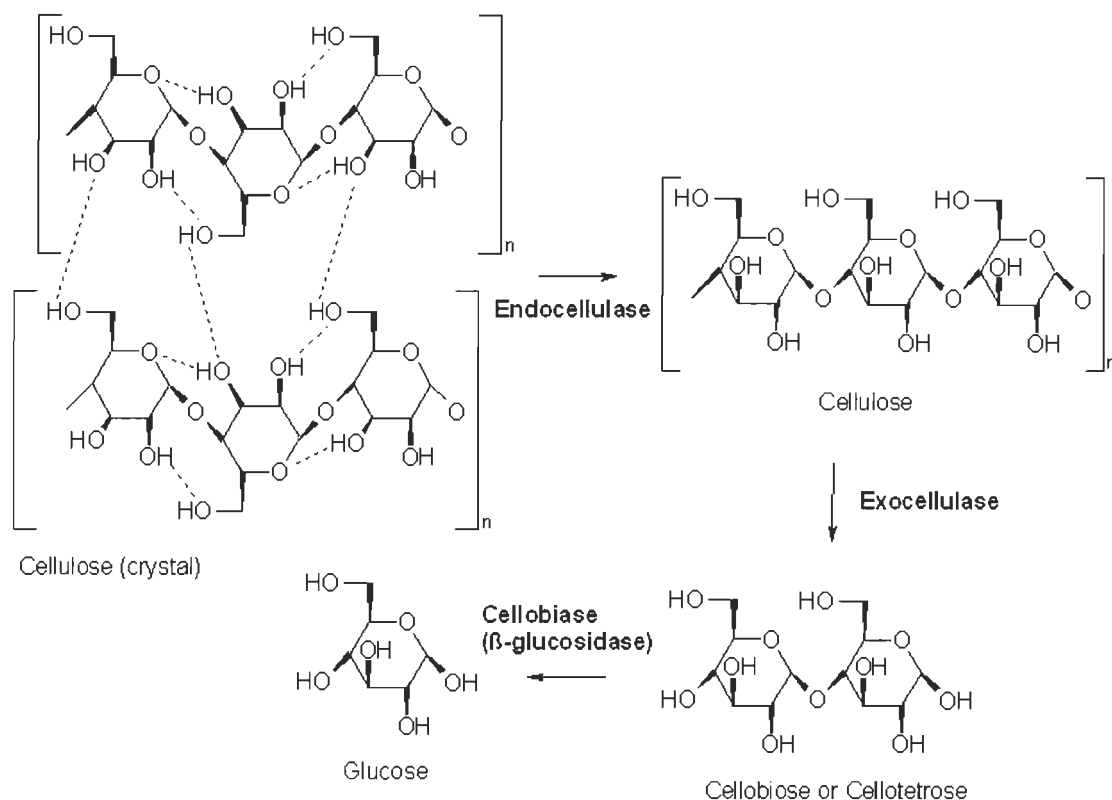


- La cellobiase ou bêta-glucosidase hydrolyse le produit de l'endocellulase en monosaccharides individuels.

Il a été constaté que les préparations enzymatiques contenant uniquement des endocellulases ont peu d'effet sur la cellulose native (non traitée). Par contre, celles contenant à la fois des endo et des exocellulases entraîneront une dégradation importante de la cellulose native. Ainsi, les endo et les exocellulases semblent fonctionner de manière synergique ou coopérative sur la cellulose native.



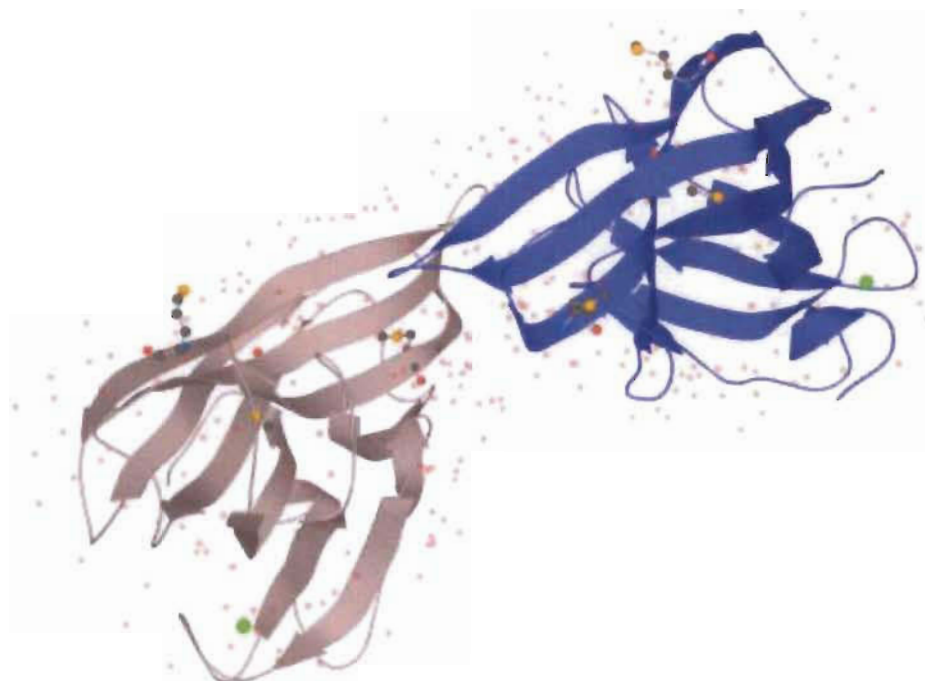
**Figure 1.11** Structure 3D de l'enzyme cellulase, E.C : 3.2.1.4 [55].



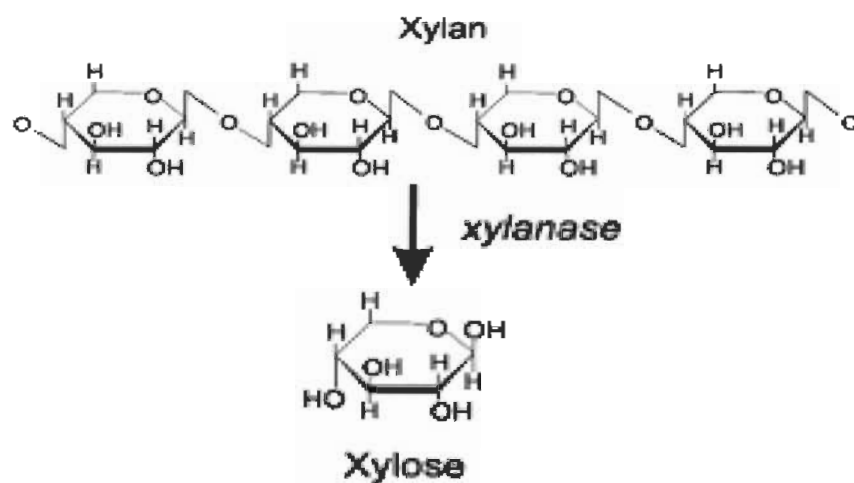
**Figure 1.12** Réaction enzymatique de l'hydrolyse de la cellulose via le complexe d'enzyme cellulase (endocellulase, exocellulase et cellobiase) en des sous-unités de glucose [51].

### 1.5.2 Les xylanases

Un autre type d'enzyme choisie qui est utilisée surtout dans les industries pâtes et papiers est la xylanase (EC 3.2.1.8, alias: endo- (1-> 4) bêta-xylane 4-xylanohydrolase, endo-1,4-xylanase, endo-1,4-bêta-xylanase, bêta-1,4-xylanase, endo -1,4-beta-D-xylanase, erslanase) (Figure 1.13). C'est le nom donné à une classe d'enzymes qui dégradent le polysaccharide linéaire bêta-1,4-xylane en xylose [1], décomposant ainsi l'hémicellulose, l'un des composants majeurs des parois cellulaires des plantes (Figure 1.14).



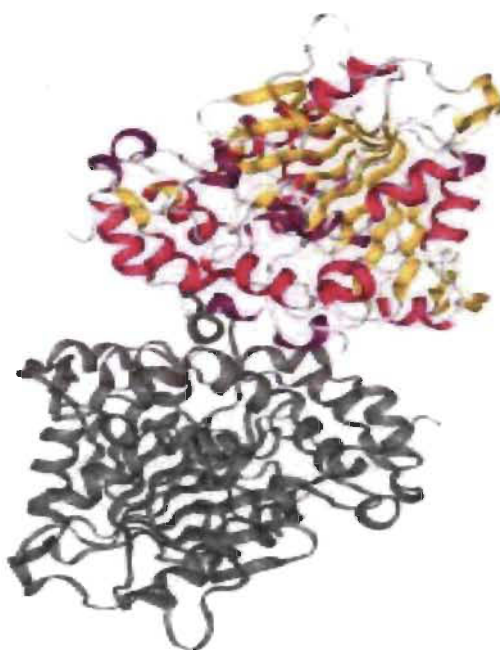
**Figure 1.13** Structure 3D de l'enzyme xylanase, E.C : 3.2.1.8 [56].



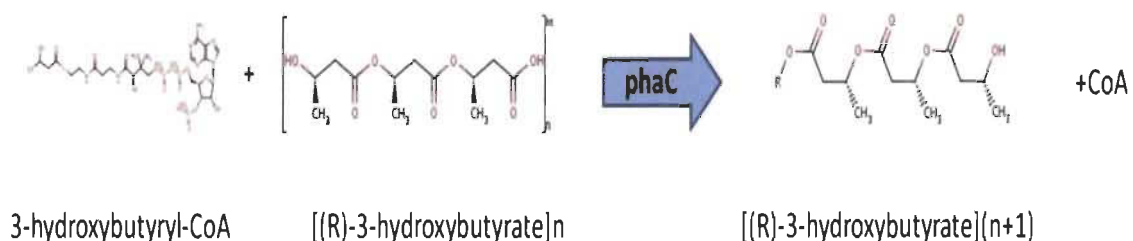
**Figure 1.14** Réaction enzymatique de l'hydrolyse du xylan via une xylanase en des sous-unités de xylose [57].

### 1.5.3 La polyhydroxylakanoate synthase (PHA synthase) ou PHAc

Un autre type d'enzyme intéressant à citer dans le cadre de cette thèse, c'est la PHA synthase ou PHAc (Figure 1.15). Les PHA synthases sont les enzymes clés de biosynthèse du PHA qui est un bioplastique biodégradable produit sous des conditions de stress par les bactéries. Les enzymes de type PHAc utilisent la coenzyme A (CoA) et des thioesters d'acides hydroxylalcanoïques (HA) comme substrats et catalysent la polymérisation des HA en PHA avec le relargage d'une CoA (Figure 1.16).



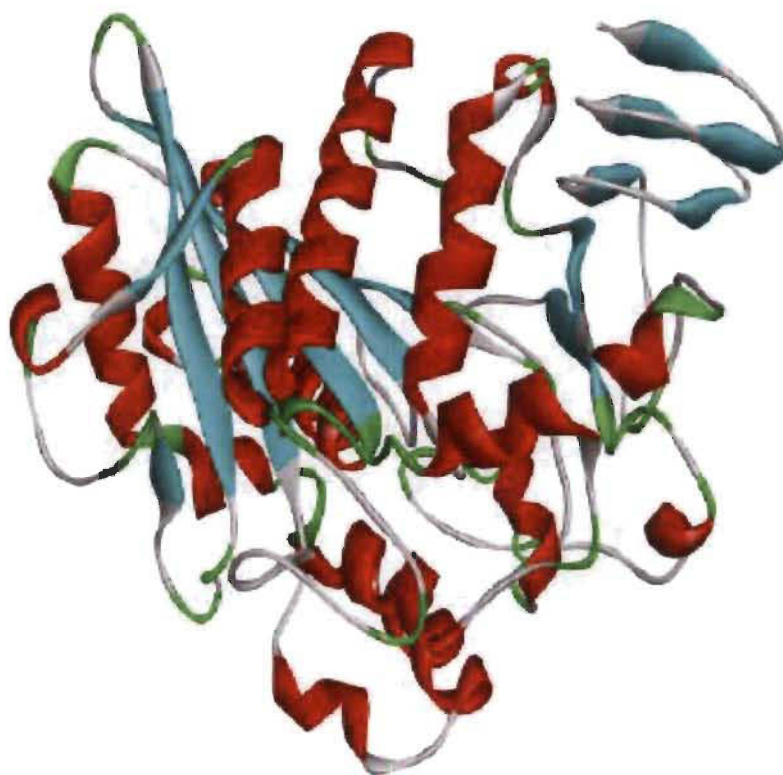
**Figure 1.15** Structure 3D de l'enzyme PHAc, E.C.2.3.1 [58].



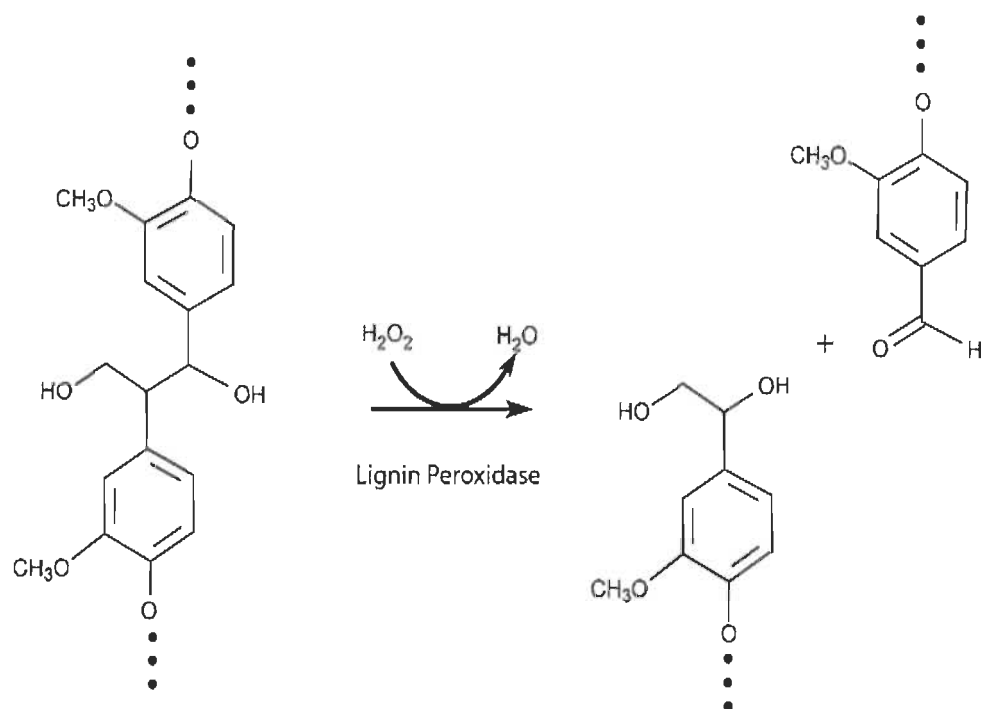
**Figure 1.16** Réaction enzymatique menant à la polymérisation du PHA via la PHAc [59].

#### 1.5.4 La lignine peroxidase (LiP)

Cette enzyme est une oxidoréductase produite majoritairement par les mycètes du genre *Phanerochaete* mais aussi par certaines bactéries discutées par la suite dans cette étude (Figure 1.17). Elle permet, avec le manganèse peroxydase, de dégrader la lignine du bois en faisant intervenir de l'alcool de vératryle (Figure 1.18).



**Figure 1.17** Structure 3D de l'enzyme lignine peroxidase LiP EC 1.11.1.14 [60].



**Figure 1.18** Réaction enzymatique de dépolymérisation de la lignine via une lignine peroxidase en fragments de lignine. Adaptée de [61].

## 1.6 Les applications des bactéries productrices d'enzymes

Ces enzymes peuvent être exploitées par l'homme pour diverses applications. De plus, elles ont la capacité de fonctionner à température, pression et pH modérés- correspondant aux souches bactériennes d'origine qui les produisent-, ce qui en fait des catalyseurs attrayants pour les processus de conversion industriels et même domestiques.

Les premiers rapports sur l'utilisation industrielle « moderne » des produits à base d'enzymes remontent au début du siècle dernier. C'est le scientifique allemand Röhm qui a introduit l'utilisation d'extraits de pancréas de bovin pour éliminer les tâches sur les vêtements sales [62] [63]. Vers la même époque, le Laboratoire Amylo en France a expérimenté l'utilisation d'extrait de *Bacillus* pour la conversion de l'amidon en sucres [64]. Avec le développement des fermentations microbiennes dans la seconde moitié du siècle dernier, le nombre de processus industriels facilités par les enzymes et les quantités d'enzyme produites ont fortement augmenté dans le monde. À l'heure actuelle, la disponibilité d'enzymes très spécifiques et bon marché résultant de l'ingénierie

génétique et protéique a grandement contribué à faire renaître l'intérêt pour l'application industrielle des enzymes d'origine bactérienne. D'ailleurs des informations sur les enzymes spécifiques disponibles et leurs spécificités de substrat peuvent être trouvées dans plusieurs bases de données [65] [66].

Les enzymes bactériennes industrielles les plus couramment utilisées sont les enzymes hydrolytiques (protéolytiques, amylolytiques ou lipolytiques). Ces enzymes n'ont pratiquement pas besoin de cofacteurs, ce qui permet leur application dans une grande variété de conditions. En raison de la polyvalence et de la stabilité des enzymes hydrolytiques, la même enzyme peut être utilisée dans des processus totalement différents.

Le tableau suivant (Tableau 1.1) résume l'utilisation actuelle des enzymes dans diverses applications industrielles (textiles, papetières, bioremédiation, etc.) et domestiques (alimentaires, détergents, etc).

**Tableau 1.1**

Exemples d'enzymes bactériennes et leurs utilisations [67] [68] [69]

Enzymes bactériennes	Numéro EC	Source	Intra/extra-cellulaire	Échelle de production	Utilisation industrielle
$\alpha$ -Amylase	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	E	+++	Amidon
$\beta$ -Amylase	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	E	+	Amidon
Asparaginase	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	I	-	Santé
Glucose isomerase	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	I	++	Sirop de fructose
Penicilline amidase	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	I	-	Pharmaceutique
Protéase	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	E	+++	Détergent
Pullulanase	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	E	-	Amidon
Cellulase	3.2.1.4	<i>Pseudomonas</i>	E	+	Pâte et papier
Xylanase	3.2.1.72	<i>Clostridium</i>	E	+/-	Pâte et papier
Lignine peroxidase	1.11.1.14	<i>Raoultella</i>	E	+	Textile

- : pas de production à grande échelle, + : production à grande échelle, +/- : une assez moyenne production à grande échelle, ++ : bonne production à grande échelle, +++ : très grande production à grande échelle, I : intracellulaire, E : extracellulaire

Dans cette thèse, nous mettrons l'accent sur les enzymes bactériennes que nous avons criblées à partir des deux échantillons environnementaux, à savoir les boues papetières et les huiles usées de moteur.

## **1.7 Quand la nature aide la nature**

La Terre est une planète qui répond aux besoins des êtres humains. Elle fournit tout ce qui est nécessaire à leur survie: eau, air, nourriture, etc. Cependant, elle a besoin d'équilibre pour se régénérer. Malheureusement, depuis plusieurs années, la Terre est menacée plus que jamais par la pollution, le réchauffement climatique, la surproduction, etc.

Ce qui se reflète négativement sur la biodiversité. Cette dernière (la biodiversité) est en perpétuel déclin. Les écosystèmes sont dégradés, les sols et les ressources naturelles sont sous pression, les milieux aquatiques sont souillés, la pollution atmosphérique est alarmante et les déchets sont peu recyclés. C'est un tableau plus noir que vert que dresse le rapport 2015 de l'Agence européenne pour l'environnement (AEE) [70]. Cette synthèse couvrant plusieurs pays de l'Union européenne et d'autres pays à travers le monde démontre que la situation environnementale est en train de dégénérer et de s'aggraver.

Les principaux responsables de cette dégénération de l'environnement demeurent essentiellement les activités industrielles et économiques générant une multitude de composés plus ou moins toxiques pour les organismes vivants. Nous allons dans cette thèse s'intéresser à deux industries particulièrement polluantes et différentes en termes de produits générés : l'industrie des pâtes et papiers et l'industrie de recyclage des huiles usées de moteur.

### **1.7.1 L'industrie des pâtes et papiers**

Le premier exemple de pollution auquel on s'intéresse dans cette thèse c'est la pollution causée par les industries papetières. En 1999, le Québec était le deuxième



producteur mondial de papiers au monde selon un rapport environnemental [71], produisant 10 % du papier journal du monde entier. En 2001, le Québec a produit 41,3 % du papier journal du Canada. Ces chiffres donnant une idée sur l'ampleur de la production par le Québec laissent présager des dangers environnementaux emblématiques. Parmi ces dangers on peut parler du déversement des effluents toxiques dans les rivières avoisinantes de l'industrie ce qui est extrêmement néfaste à la faune et la flore. Les effluents d'usines de pâte et papiers contiennent une grande variété de composés chlorés. Ces produits organochlorés rejetés par les usines de pâtes et papiers risquent de nuire même la santé humaine à la suite d'une exposition à long terme par consommation d'eau potable et à la suite d'une bioaccumulation par consommation de produits de mer et de rivières contaminés. D'où l'importance de valoriser ces déchets.

Les eaux usées et les boues générées par les procédés de fabrication du papier sont aussi enrichies de divers composés de bois comme la lignine, les polymères glucidiques (cellulose et hémicellulose) et d'autres substances extractibles (lipides par exemple), des métaux lourds et autres [72] [73] [74] [75].

Considérant la diversité de substrats carbonés trouvés dans une usine à papier, les boues papetières pourraient être des incubateurs efficaces d'une grande biodiversité bactérienne et d'une variété de microorganismes résistants et acclimatés et devraient constituer une source idéale d'enzymes adaptées à des applications industrielles connexes. Dans l'industrie des pâtes et papiers, on peut distinguer différents types de boues : les boues primaires (nommée IS pour *primary I sludge*) correspondent aux boues produites par un équipement de clarification, tels que le décanteur, la cellule de flottation, la lagune de sédimentation, et autres.

Les boues secondaires (SII pour *Secondary II Sludge*) sont celles produites lors du traitement biologique des eaux de procédé de la fabrique. Les boues de presse (PS pour *Press sludge*) sont constituées de boues mixtes (boues primaires et secondaire en mélange) et sont issues du traitement des effluents des papeteries. Ces boues proviennent des résidus d'un procédé de recyclage du papier donc sont très riches en fibres de cellulose et ses

dérivés. Les boues de machines (MS pour *Machine sludge*) sont des boues qu'on a retrouvées à proximité des machines à papier à l'intérieur de l'usine.

Des études précédentes sur la microflore des boues papetières ont déjà été rapportées. Certaines recherches de [76] [74] [77] [78] ont montré que les boues papetières sont un excellent incubateur et hôte pour une variété de micro-organismes. De telles études se sont concentrées sur un type précis de procédé, ont utilisé un seul type de boue et se sont focalisées sur une enzyme particulière. Elles ont révélé des informations limitées sur les boues papetières que nous allons compléter ici par une étude beaucoup plus élaborée.

### **1.7.2 Les huiles usées de moteur HUM (ou huiles de vidange d'automobile)**

L'Homme a énormément contribué à la génération de catastrophes environnementales multiples liées à l'exploitation des produits pétroliers, dont on peut citer quelques-unes :

1989 : Marée noire de l'Exxon Valdez sur les côtes de l'Alaska (37 000 tonnes de produits pétroliers) [79].

2010 : Naufrage d'une station pétrolière en Louisiane (*Deepwater Horizon*) [80].

Ces catastrophes environnementales sont principalement générées par l'extraction, la transformation et l'utilisation des produits pétroliers. Ceci peut causer la contamination par des composés organiques que l'on retrouve dans le pétrole brut, les fiouls, les essences, les lubrifiants et même des composés inorganiques tels que les métaux lourds (arsenic, plomb, chrome, cuivre, nickel, mercure, cadmium), qui peuvent causer beaucoup de dommages au niveau de la faune et la flore. En effet, ces polluants contaminent tous les compartiments de l'environnement : le sol, l'eau, l'air et la biosphère. Selon la base des données BASOL [81], les hydrocarbures, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les solvants halogénés et les métaux lourds sont les composés le plus souvent rencontrés, seuls ou en mélanges, sur les sites et les sols pollués. Ces substances plus ou moins mobiles se déplacent soit sous forme particulaire dans l'atmosphère, soit en solution

dans les eaux de surface ou souterraines. Elles peuvent alors atteindre différents écosystèmes. De par leurs caractéristiques physico-chimiques, ces composés présentent des dangers pour l'environnement et les organismes vivants. Ils entrent dans la chaîne alimentaire, et finissent, à terme, par menacer la santé humaine. Il est donc primordial de mettre en œuvre des moyens de dépollution des sites contaminés. Leur réhabilitation peut être réalisée par traitement physico-chimique sur site ou après excavation des sols, mais ces techniques demeurent coûteuses et non respectueuses des écosystèmes [82]. Un des produits pétroliers responsable de la dégradation environnementale est l'huile usée de vidange de moteur. Dans cette thèse nous avons choisi ce type de déchet pour étudier sa composition chimique et la composition microbiologique en termes de biodiversité des bactéries et leurs enzymes qui y sont associées.

Il existe au Québec des recycleurs des huiles usées de moteur. Ce sont des compagnies privées dont l'activité consiste à récupérer les huiles usagées des automobiles et les utiliser pour le chauffage des serres, ou comme additifs au mazout pour l'épandage routier. Ces huiles usées proviennent principalement des lubrifiants automobiles et des lubrifiants industriels (circuit hydraulique, turbine, isolante, trempe des métaux, fluides caloporteurs) qu'on retrouve dans les points de collecte lorsque les intervenants respectent les normes en vigueur. Ces huiles usagées moteurs, une fois analysées à la sortie des carters, renferment un grand nombre de polluants : des suies, des résines, des métaux lourds, des acides organiques provenant de l'oxydation partielle de l'huile, du chlore provenant de certains additifs de lubrification, des composés aromatiques parmi lesquels des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP), des phénols, des phtalates. Ces huiles sont donc classées dans la catégorie des déchets dangereux en application de l'annexe II (rubrique 13.02) de l'article R 541-8 du code de l'environnement [83].

### **1.7.3 Valorisation des boues papetières et huiles usées de moteur**

Ce projet de thèse vise à valoriser la biodiversité microbienne de diverses façons. Premièrement, nous voulons déterminer la biodiversité bactérienne des substrats naturels existant dans leur milieu d'origine et les comparer entre elles en termes de population bactérienne dominante et/ou distincte. Vu que la compréhension et le maintien la

biodiversité bactérienne sont devenus un domaine de recherche de plus en plus important et un objectif de gestion des ressources, il est important de comprendre que dans l'environnement les communautés microbiennes maintiennent également d'autres fonctions critiques pouvant être plus importantes que le maintien de la diversité taxonomique. Deuxièmement, on va étudier les activités enzymatiques des bactéries criblées à partir des échantillons des déchets environnementaux afin de pouvoir les associer aux caractères physico-chimiques, la composition de leur milieu natif [84], et la structure de leur communauté microbienne [85] [86]. En plus de l'adaptation des bactéries à leur environnement, il est à noter que leur machinerie enzymatique également change et s'adapte aux conditions et aux paramètres du milieu. D'ailleurs, lors de cette thèse on va démontrer que certaines enzymes apparaissent chez une population bactérienne donnée dans un certain environnement et disparaissent (pas d'activité ou pas de production enzymatique) dans un autre type d'environnement différent pour le même genre bactérien. Il est à noter que ces enzymes sont très importantes dans le domaine de la biotechnologie. Outre leur utilisation comme usines de production d'enzymes, les microorganismes suscitent un intérêt croissant pour leurs voies de biosynthèse, y compris celles menant à la synthèse de plastiques biodégradables tels que les polyhydroxyalcanoates (PHA) [87] [88]. La production du PHA via des enzymes bactériennes est devenue un sujet d'actualité. Le polymère de PHA est synthétisé et accumulé par les bactéries pour stocker le carbone et l'énergie lors de conditions de croissance déséquilibrées [89]. Des applications pour les PHA ont été développées dans divers domaines tels que les bioplastiques, la chimie fine, les biomatériaux d'implant, les médicaments et les biocarburants [90] [91].

## **1.8 Les biopolymères bactériens : les enjeux de demain**

### **1.8.1 Les polyhydroxyalcanoates : biopolymères intracellulaires**

#### ***1.8.1.1 Définition***

Les bactéries sont capables de convertir plusieurs substrats en polymères (soit sous forme de stockage des réserves énergétiques, soit comme des sous-produits de consommation de substrats résultants des voies enzymatiques).

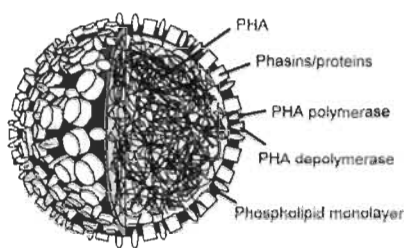
En effet, certains biopolymères peuvent être vus comme une alternative permettant de se passer du polymère pétrolier. Se servir des micro-organismes (le plus souvent des bactéries) qui vont synthétiser les monomères indispensables à la production de plastique est devenue une solution possible d'intérêt majeure. On peut citer à titre d'exemple le PHA comme étant un biopolymère intracellulaire pouvant remplacer les plastiques pétrochimiques.

Les PHA sont des polymères d'hydroxycarboxylates biodégradables produits par divers micro-organismes, y compris des bactéries. Lorsqu'ils sont fabriqués par ces bactéries, les PHA sont générés par la fermentation bactérienne de sucres ou de lipides et sont produits dans des conditions de croissance déséquilibrées (nous les appelons conditions de famine et de festin), puis stockés dans la cellule bactérienne en tant que stock de carbone et source d'énergie. Certaines bactéries pourraient produire du PHA jusqu'à 90 % (p/p) de cellules sèches lors de l'épuisement de nutriments essentiels tels que l'azote, le phosphore ou le magnésium dans leur milieu de culture [92].

À l'intérieur de la cellule bactérienne, le PHA est accumulé dans des granules ou des vésicules (Figure 1.19). Une fois formés, le PHA et d'autres monomères apparentés (polyhydroxybutyrate PHB, polyhydroxyvalérate PHV, etc.) sont stockés dans la cellule sous la structure d'un corps d'inclusion (granules de PHA/granules de PHB). Des études telles que [93] ont montré que ces granules ne sont pas que des réserves d'énergie, mais aussi des complexes supramoléculaires ayant des fonctions spécifiques. La dénomination « carbonosome » a été ainsi proposée pour indiquer la multifonctionnalité des granules de PHA [94].

La même étude a révélé que lorsqu'ils sont exposés à des contraintes chimiques (traitement avec des alcalis ou des solvants, par exemple), physiques (gel, agglomération par centrifugation) ou biochimiques (traitement avec des enzymes, des composés bioactifs), les granules de PHA (y compris le PHB et d'autres polymères) peuvent rapidement se dénaturer et devenir résistantes à l'attaque des PHB dépolymérases (enzymes capables de dénaturer le PHA dans les bactéries) intracellulaires [95] [96] et

ainsi assurer leur dégradation et leur utilisation comme source d'énergie. La même étude a mis en évidence le fait que les chaînes de ces polymères sont généralement à l'état amorphe dans du PHB natif, alors que le PHB dénaturé a une fraction considérablement cristalline. Il est à espérer que les recherches futures sur la structure de ces polymères PHA permettront de vérifier cette nouvelle théorie du caractère amorphe et de la cristallinité de ces polymères [97].

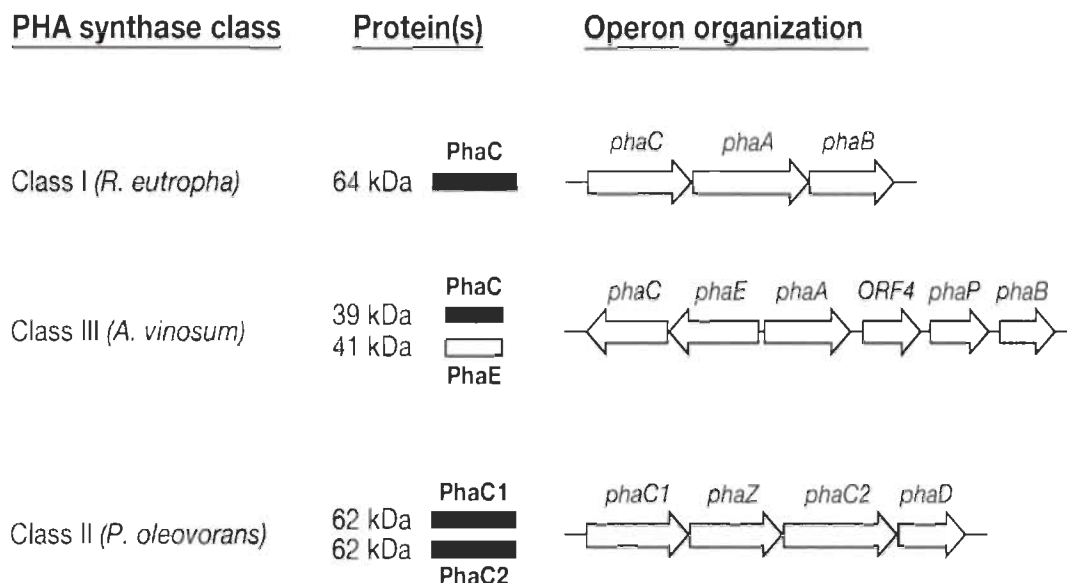


**Figure 1.19** Composition d'un granule de PHA [98].

#### **1.8.1.2 Les gènes responsables de la production du PHA**

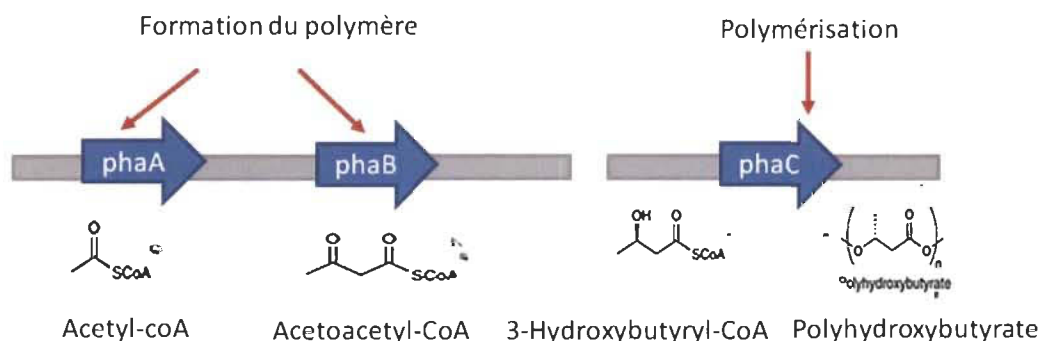
En fait, la formation du polyhydroxyalcanoate et de ses granules est codée par des gènes standards dans la cellule bactérienne. Ces gènes sont classés en trois grandes classes (I, II et III) (Figure 1.20) et caractérisés par leur organisation typique. Différents groupes ont été discutés dans la littérature, nous pouvons ici déterminer (*phaC*, synthase; *phaA*,  $\beta$ -cétothiolase; *phaB*, réductase; *phaP*, protéine phasine; *phaE*, un composant de la synthase hétérodimère de classe III, comme discuté par [99]). Ces classes peuvent être distingués en fonction de leurs structures primaires, ainsi que du nombre de sous-unités et la spécificité au substrat [100], permettant l'utilisation de 150 substances chimiquement différentes (des monomères) [101].

L'organisation de ces gènes et des classes générées sera discutée par la suite. Les PHA sont synthétisées par de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif [102]. Les PHA synthases codées par les gènes *phaC* sont les enzymes clés qui polymérisent des monomères de PHA [59] (Figure 1.21). La composition de PHA est clairement affectée par le choix du microorganisme et de la source de carbone [103] [102].



**Figure 1.20** Les 3 différentes classes de gènes responsables de la production du PHA [87].

Les classes les plus étudiées sont les PHA synthases I et II, comprenant enzymes qui consistent en un seul type de sous-unité (PhaC). La PHA synthase classe I polymérise les PHA à chaîne courte (scl-PHA), tandis que la classe II polymérise des chaînes de taille moyenne PHAs (mcl-PHA), possédant des propriétés rhéologiques différentes souhaitables dans le domaine de la biotechnologie [104] [88] [105].



**Figure 1.21** Principaux gènes responsables de la production de PHA et les molécules correspondantes produites schématisées en dessous des gènes. Adaptée de [102].



### 1.8.2 Les biopolymères extracellulaires

Dans les travaux de cette thèse, nous sommes les premiers à observer un nouveau type de polymère extracellulaire produit par un consortium bactérien (composé de deux bactéries : *Rhodococcus* et *Stenotrophomonas*). Ce biopolymère est doté des caractéristiques d'un élastomère très connu qui est l'EPDM (éthylène-propylène-diène monomère) selon l'interprétation de son spectre FTIR. Ces polymères du type EPDM sont des élastomères spéciaux, introduits sur le marché en 1963. Ces ter-polymères amorphes sont obtenus en copolymérisant dans des proportions variables l'éthylène (le ter-polymère contient de 60 à 85 % de motifs éthylène) et le propylène, avec un faible taux de diène non conjugué. La polymérisation n'utilise qu'une double liaison du diène [106]. Nous avons ainsi tenté lors de cette thèse de découvrir les mécanismes enzymatiques responsables de la formation de ce nouveau biopolymère extracellulaire, par spectroscopie de masse.

## 1.9 Hypothèses

Tout au long de cette thèse, nous voulons infirmer ou confirmer l'existence d'une relation spécifique entre la diversité bactérienne et le milieu environnemental, c'est-à-dire que les bactéries dépendent (ou pas) de leur environnement via les différents paramètres du milieu. En effet, nous supposons que cette relation est soit monoparamétrique comme dans le cas où la diversité bactérienne dépend principalement de la présence d'un seul élément dans le milieu (exemple : le substrat), ou soit multiparamétrique où la relation de la bactérie avec son environnement est en fonction de différents éléments du milieu (pH, température, aération, humidité, nutriments, etc.).

Nous supposons également que l'application enzymatique des bactéries est en fonction de leur environnement.

Plus spécifiquement, dans le cas des bactéries isolées de l'industrie papetière, nous proposons les hypothèses spécifiques suivantes :



**Hypothèse 1 :** Les différents milieux d'échantillonnage au sein de la même papetière disposeront d'une diversité bactérienne différente en vue de leur substrat.

**Hypothèse 2 :** Le profil enzymatique bactérien est en fonction au milieu de l'échantillonnage.

**Hypothèse 3 :** Il existe une relation étroite entre le milieu industriel et l'application industrielle qui lui est relative.

Alors qu'au niveau des huiles usées de moteur, nous avons émis les hypothèses suivantes :

**Hypothèse 1 :** La diversité bactérienne des HUM devrait être en relation étroite avec le climat.

**Hypothèse 2 :** Les bactéries peuvent synthétiser des polymères naturels en utilisant le substrat de leur milieu.

## **1.10 Objectifs**

### **1.10.1 Objectifs généraux**

L'objectif général de cette thèse est d'identifier la biodiversité bactérienne de deux échantillons environnementaux très différents en termes de leur composition et étudier la biodiversité enzymatique reliée à ces bactéries identifiées pour finalement identifier leur potentiel d'application industrielle. Avec cette étude, nous espérons faire avancer la compréhension de quelques concepts qui restent ambigus dans la compréhension de la biodiversité :

- Déterminer les ou le facteur(s) décisif(s) à la biodiversité d'un milieu industriel
- Déterminer le rôle des enzymes dans la biodiversité

- Élucider la relation entre le profil enzymatique et le potentiel d'applications industrielles

Nous reviendrons plus en détail sur ces objectifs pour chacun des milieux industriels utilisés dans la section « Objectifs spécifiques ».

### **1.10.2 Objectifs spécifiques**

#### ***1.10.2.1 Premier objectif spécifique***

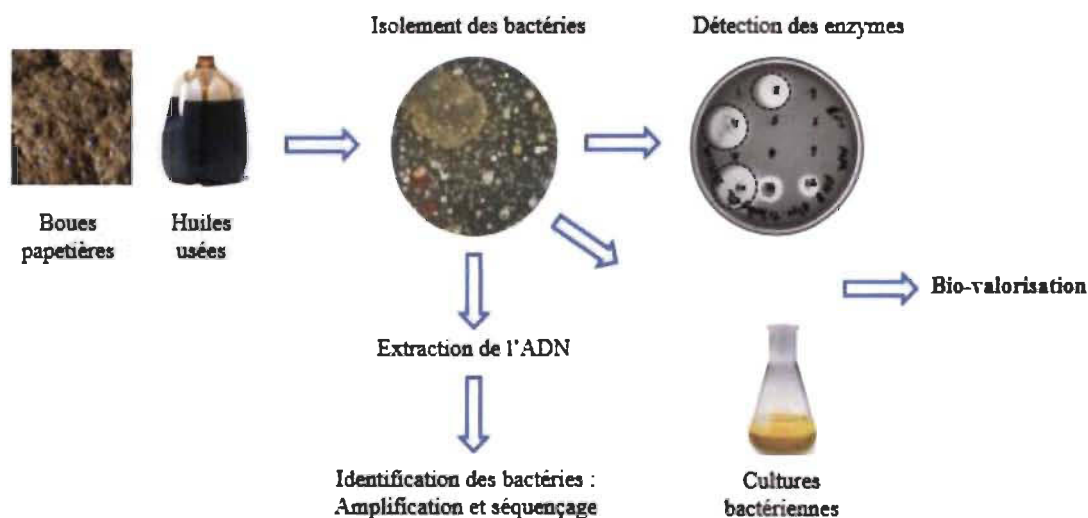
Le premier objectif de cette thèse concerne l'étude des boues papetières et leur biodiversité, en termes de genres et espèces bactériennes viables et cultivables. Par la suite, nous chercherons à identifier les enzymes extracellulaires produites par ces bactéries et ayant un intérêt industriel et ceci par des méthodes rapides de criblage.

Dans cet objectif, nous visons à tester ces bactéries *in situ* en combinaison avec des substrats (des milieux industriels) (huiles usées de moteur, boues papetières, liqueurs papetières) et des substrats synthétiques semblables à ceux trouvés dans leurs milieux naturels (cellulose, hémicellulose, lignine, etc.) pour confirmer si elles ont ou pas la machinerie enzymatique nécessaire pour les dégrader. Enfin nous allons essayer de détecter leur potentiel enzymatique à produire du bioplastique biodégradable (Article 1, Chapitre I).

#### ***1.10.2.2 Deuxième objectif spécifique***

Le deuxième objectif spécifique se focalise sur le deuxième type d'échantillon utilisé qui est l'huile usée de moteur (HUM). Pour cet échantillon extrême, nous allons également étudier la biodiversité bactérienne, isoler les souches viables et mettre à jour leur potentiel de production des enzymes extracellulaires, ainsi que leur potentiel de production de biopolymères extracellulaires (Article 2, Chapitre II).

Nous proposons également de tester ces microorganismes de façon individuelle et en consortium pour élucider leur potentiel de bio-valorisation industrielle au niveau de la production d'un biopolymère extracellulaire. Enfin, nous avons tenté d'identifier les enzymes impliquées dans la production de ce biopolymère par une identification avec la spectrométrie de masse.



**Figure 1.22** Schéma des étapes principales sous-jacentes à l'atteinte des objectifs.

Une approche rationnelle était utilisée pour isoler les bactéries à partir de leurs niches écologiques et les identifier génétiquement pour pouvoir par la suite leur assimiler les activités enzymatiques respectives détectées à chaque souche bactérienne. À la fin de cette approche, nous avons identifié les potentielles applications industrielles possibles via ces souches.

Le chapitre II contient une étude démontrant la biodiversité de l'industrie papetière Kruger-Wayagamack à Trois-Rivières ainsi que le potentiel enzymatique des bactéries isolées de leurs rejets.

## CHAPITRE II

### MICROBIAL DIVERSITY IN VARIOUS TYPES OF PAPER MILL SLUDGE: IDENTIFICATION OF ENZYME ACTIVITIES WITH POTENTIAL INDUSTRIAL APPLICATIONS

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *SpringerPlus*, 2016.

**Manel Ghribi<sup>1,2</sup>, Fatma Meddeb-Mouelhi<sup>1,2</sup> and Marc Beauregard<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> CRML, Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques, Université du Québec à Trois-Rivières, (Québec) G9A 5H7, Canada

<sup>2</sup> PROTEO, Université Laval, (Québec) G1V 4G2, Canada

#### **2.1 Contribution des auteurs**

MG, FM et MB ont planifié une stratégie d'échantillonnage et des travaux expérimentaux. MG et FM ont échantillonné et géré les souches rapportées ici. La caractérisation a été effectuée par MG et modifiée par FM et MB qui ont effectué les corrections finales. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

## **2.2 Résumé de l'article (français)**

Cette étude est la première enquête complète sur des bactéries productrices d'enzymes isolées à partir de quatre échantillons de boues (primaire, secondaire, presse et échantillons à côté des machines) collectées dans une usine de papier kraft. Au total, 41 souches comprenant 11 genres différents ont été identifiées par identification du gène ARNr 16S et des tests biochimiques. La biodiversité et les activités enzymatiques étaient corrélées à la composition des boues. Les boues de presse hébergeaient la plus grande variété de souches bactériennes et d'activités enzymatiques, comprenant les enzymes hydrolytiques et les enzymes ligninolytiques.

En revanche, les souches isolées à partir de boues secondaires étaient dépourvues de plusieurs activités enzymatiques. La plupart des souches bactériennes métabolisaient la liqueur Kraft à son pH alcalin et décoloraient les colorants industriels semblables à la lignine. Nous démontrons dans cet article que les souches bactériennes trouvées dans une usine de papier Kraft typique représentent une nouvelle source d'enzymes pour les applications industrielles et la bioremédiation.

### **2.3 Article complet (anglais) : Microbial diversity in various types of paper mill sludge: identification of enzyme activities with potential industrial applications**

#### **Abstract**

This study is the first comprehensive investigation of enzyme-producing bacteria isolated from four sludge samples (primary, secondary, press and machine) collected in a Kraft paper mill. Overall, 41 strains encompassing 11 different genera were identified by 16S rRNA gene analysis and biochemical testing. Both biodiversity and enzymatic activities were correlated with sludge composition. Press sludge hosted the largest variety of bacterial strains and enzymatic activities, which included hydrolytic enzymes and ligninolytic enzymes. In contrast, strains isolated from secondary sludge were devoid of several enzymatic activities. Most strains were found to metabolize Kraft liquor at its alkaline pH and to decolorize industrial lignin-mimicking dyes. Resistance to lignin or the ability to metabolize this substrate is a prerequisite to survival in any paper mill sludge type. We demonstrate here that the bacterial strains found in a typical Kraft paper mill represent a source of potential novel enzymes for both industrial applications and bioremediation.

**Keywords:** Bacteria, Enzymes, Bioplastic, Pulping liquors, Dyes

## Background

Industrial enzymes are at the heart of green chemistry as illustrated by a global market value that reached 5 G\$ in 2013 which is expected to climb to 7 G\$ by 2018, a compound annual growth rate of 8.2 % over 5 years (Global Markets for Enzymes in Industrial Applications; Nigam and Pandey 2009). While all living organism produce enzymes, microorganisms have been and are increasingly being used as cell factory for enzyme production, and as a source for various chemicals (therapeutics, bioethanol and bioplastics to name few) (Adrio and Demain 2005; Ai et al. 2003; Charbonneau et al. 2011; Demain and Adrio 2008; Paye et al. 2015; Rehman et al. 2007). Currently, most industrial enzymes originate from microorganisms like *Bacillus*, *Aspergillus* and *Trichoderma* (Apparao and Krishnaswamy 2015; Arora and Sandhu 1985; Bengtsson et al. 2006; Demain and Adrio 2008; Kubicek et al. 2001; Liu et al. 2013; Pandey et al. 1999). These biocatalysts have found applications in various fields that depend on hydrolytic, ligninolytic and biosynthetic processes, to name a few (Barr and Steven 1994; Braunegg et al. 2004; Chandra et al. 2011; Martínez et al. 2005; Nigam 2013).

Hydrolases (or hydrolytic enzymes) are the largest group of enzymes on the market and are used in detergents, pharmaceuticals, therapeutics, textiles, baking, biofuel and pulp and paper (Bengtsson et al. 2006; Crecchio et al. 1995; Eriksson and Kirk 1994; Kirk et al. 2002). Hydrolases include carboxyl ester hydrolases (lipases, esterases), glycosylases (cellulases, xylanases and amylases) and proteases that hydrolyze lipids, sugar polymers and proteins, respectively. Application of ligninolytic enzymes [lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and laccase (Lac)] is a growing sector of industrial enzymology. In recent years ligninolytic enzymes have been shown to be effective in industrial applications, including bio-remediation, pollution control and treatment of industrial effluents containing recalcitrant and hazardous chemicals such as textile dyes and or lignin mimicking dyes, phenols and other xenobiotic (Bandounas et al. 2011; Brahimi Horn et al. 1992; Chandra et al. 2011). This group of enzymes is also used in the pulp and paper industry for pre-treatment of wood pulp, for bio-bleaching and bio-pulping (Eriksson and Kirk 1994; Huang et al. 2007).



In addition to their use as enzyme production factories, microorganisms have attracted a growing interest for their biosynthetic pathways, including those leading to the synthesis of biodegradable plastics, such as polyhydroxyalkanoates (PHAs) (Singh et al. 2009; Verlinden et al. 2007). PHA polymer is synthesized and accumulated by bacteria as means for storing carbon and energy during unbalanced growth conditions (Chen 2009). Applications for PHA have been developed in various fields such as bioplastics, fine chemicals, implant biomaterials, medicines and biofuels (Gomaa 2014; Nathalie et al. 2015).

Screening bacteria for industrially useful enzymes is now a key endeavor in industrial biotechnology. Bacteria and bacterial enzymes are becoming much more important for the treatment of lignocellulosic materials, as some outperforming commercial fungal extracts for the hydrolysis of cellulose and hemicellulose fibers (Hardiman et al. 2010; Maki et al. 2011; Singh and Prabhu 1986; Zhou and Ingram 2000). Bacteria generally inhabit ecological niches characterized by specific attributes such as pH, temperature, specific carbon or substrate availability, presence of salt and other chemical factors (solvent, inhibitors, toxicants, oxygen, etc.). Such attributes determine the array of enzymes and metabolic routes necessary for survival and are an important aspect of screening. In our laboratory we have taken advantage of this relationship between enzymes and niche attributes for identification of novel strains and enzymes from compost (Charbonneau et al. 2011).

The wastewaters or sludge generated from paper making processes are enriched with various fiber wood compounds such as lignin, carbohydrate polymers (cellulose and hemicellulose) and other extractives (lipids and others) in addition to some potentially toxic compounds such as chlorinated organics, resin acids, heavy metals and others (Abhay et al. 2007; CANMET Energy Technology Centre 2005; Karn et al. 2010; Kuhad et al. 1997). The sludge environments could be effective incubators of a wide variety of resistant, adapted bacteria and should offer an ideal source of enzymes suitable for related industrial applications. Consequently, investigations on paper mill sludge microflora have been previously reported. Studies by Maki et al. (2011), Karn et al. (2013, 2010),

and Desjardins and Beaulieu (2003) showed that paper mill sludge is a great incubator and host for a variety of microorganisms. Such studies have focused on a precise type of process, used a single sludge type, focused on one particular enzyme, and revealed limited information on sludge microflora. Various types of sludge are produced at different steps along the paper making process, in order to manage waste effluents. To our knowledge, the biodiversity of individual sludge types found in a Kraft paper mill has yet to be studied. Here, we report an exhaustive characterization of the microflora existing in three types of paper mill sludge and one environmental sample obtained from an Eastern Canadian Kraft paper mill. We established a screening for a wide range of extracellular enzymes produced by bacteria found in these sludge samples. We also identified bacterial strains that have various potential applications in pulp and paper, pollution control, bioremediation and bioplastic production. Sludge sampled at different production stages revealed important differences in bacterial strains and enzyme production despite being sampled at the same facility.

## **Methods**

### **Paper mill sludge sampling and characteristics**

Four sludge samples were collected from a paper mill at Trois-Rivières (Québec, Canada). Samples were collected in plastic bags under aseptic conditions and marked according to their source and location. The temperature was measured on site of collection. The collected samples were transported to the laboratory for the isolation of sludge bacteria. All sludge samples were stored at 4 °C, used and processed within 48 h. Sludge descriptions and characteristics were reported in Table 1.

**Table 1** Paper mill's sludge characteristics

Sample	Origin	Color	pH	T°C
Primary sludge (IS)	Discharges from pulp processing which are rich in cellulose-fiber and undergo settling, solid state	Dark brown	7.2	37
Secondary sludge (IIS)	Decantation of primary sludge undergo another physical settling, solid state	Dark brown	7.0	30
Press sludge (PS)	Mixture of secondary and primary sludge, solid state	Dark brown	3.0	35
Machine samples (MS)	Environmental samples found around machine in the mill, solid state	Light brown	7.2	37

Primary sludge (IS) recovered at the first step of clarification is usually obtained by sedimentation. IS sludge is dark brown in color, having a pH and temperature of 7.2 and 37 °C respectively. The secondary sludge (IIS) is generated in the clarifier of the biological unit used for wastewater treatment. IIS volumes are lower than those corresponding to the primary sludge, since most of the heavy, fibrous or inorganic solids are removed in the primary clarifier. IIS temperature and pH are slightly less than found in IS. Press sludge (PS) is a mixture of primary sludge and secondary sludge following acid treatment, and its pH and temperature are around 3 and 30 °C respectively. PS is the richest in carbonic matter due to the fact it is a concentrated mixture of two different kinds of sludges (primary and secondary). An additional sample used for this study was an environmental sample collected from organic deposits (dirt) around paper mill machines (MS). This sludge was light brown, had a neutral pH and was of moderate temperature (ambient to few degrees above ambient temperature).

### **Isolation and growth of bacteria from sludge samples**

To isolate the bacteria contained within each sludge sample, a 1.0 g sub-sample was diluted in 100 ml of saline (0.85 % NaCl), thoroughly mixed by vortexing, and incubated

for 1 h at 50 °C. After which the solution was filtered through a sterile filter paper to remove all solids. A 200 µl volume of filtrate from each sludge sample was spread on minimum media (Mm) agar plate (0.1 % NaNO<sub>3</sub>, 0.1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 % MgSO<sub>4</sub>, 0.1 % KCl, 0.05 % yeast extract and 1.5 % Bacto agar) supplemented with 1 % of the corresponding sludge with the pH of media adjusted to 7.0, the most suitable pH to enhance and promote the growth of large number of bacteria. Plates were incubated at 37 °C for 48 h. Following incubation, colonies having macroscopically different morphologies were picked from each plate and re-streaked on LB agar media to obtain pure cultures. For long term storage, isolates were grown overnight in 10 ml LB medium (pH 7.0) under agitation at 230 rpm and 1 ml of each overnight culture stored as suspension in 30 % (v/v) glycerol at -80 °C.

### **Morphological identification and physiological characterization of the different strains**

For each isolate the colony characteristics (shape, size, pigmentation, texture, and opacity), cell morphology, and Gram stain reaction were determined. Catalase and oxidase activities were determined as described by Meddeb-Mouelhi et al. (2015).

### **Screening of hydrolytic enzyme-producing bacteria**

Single colonies from fresh LB agar plates were patched onto minimal media (Mm) agar plates (0.1 % NaNO<sub>3</sub>, 0.1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 % MgSO<sub>4</sub>, 0.1 % KCl, 0.05 % yeast extract and 1.5 % Bacto agar) pH 7.0, incubated at 37 °C, and supplemented with the appropriate substrate for extracellular hydrolytic enzyme detection (Charbonneau et al. 2011). For the detection of extracellular enzyme activity, buffered Mm was supplemented with the following substrates: glyceryl tributyrat 1 % (v/v) for esterase activity; olive oil 1% (v/v) containing Rhodamine B 0.001 % (w/v) for detection of lipolytic activity (Fariha et al. 2010; Gupta et al. 2004; Jaeger and Reetz 1998); carboxymethyl cellulose (CMC) 0.5 % (w/v) for CMCase activity and Phosphoric Acid Swollen Avicel (PASA) 0.1 % (w/v) for PASAase activity (Kubicek et al. 2009; Singh and Prabhu 1986; Wang et al. 2010). Remazol Brilliant Blue-xylan (RBB-xylan) from beechwood 0.5 % (w/v) was used for

xylanase activity. Starch 1 % (w/v) was used for amylase activity (Meddeb-Mouelhi et al. 2015; Nigam and Singh 1995) and 1 % of casein (w/v) was used for protease activity (Nigam and Pandey 2009; Nigam et al. 2013; Van Dyke 2004). Lipolytic activity was visualized by illuminating the plate with UV light (302 nm) which results in an orange fluorescence detected at 535 nm around colony producing lipase (Patil et al. 2011; Sharyo 1993). Extracellular esterase activity was observed by appearance of a clear zone around the colonies (Kuhad et al. 1997; Meddeb-Mouelhi et al. 2015). CMCase and PASAase activities were detected by staining the plates using 0.2 % Congo red for 15 min and then de-stained by washing twice with 1 M NaCl for 15 min (Meddeb-Mouelhi et al. 2015). Xylanase positives clones were identified by a clear zone around the colonies on RBB-xylan plate (Meddeb-Mouelhi et al. 2015). Industrial enzymes (lipases, cellulases, xylanases and esterases purchased from Buckman North America) were used as positive controls.

### **Detection of ligninolytic enzymes**

Laccase activity was detected using Mm agar plates at pH 5.0, supplemented with 6 mM ABTS (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and 100 mM of CuSO<sub>4</sub>. After incubation at 37 °C, a positive reaction was indicated by the appearance of a green or violet color surrounding the bacterial colony (Arora and Sandhu 1985; D'Souza et al. 2009). LiP activity was screened for using Mm agar plates supplemented with 2 mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (30 %) and 0.02 % Azure B at 37 °C pH 7.0 as described by Arora and Sandhu (1985). Isolates displaying LiP activity were detected by the appearance of clear halo around the colonies (Oyadomari et al. 2003; Singh and Prabhu 1986; Wongwilaiwalin et al. 2010). The detection of MnP activity was carried out as previously described by Orth et al. (1993) using Boyd and Kohlmeyer (B&K) agar plates (0.1 % yeast extract, 0.2 % peptone, 1 % dextrose, 1 mM CuSO<sub>4</sub>, and 1.5 % Bacto agar) supplemented with 0.1 % magnesium sulfate and 0.1 % phenol red (w/v), neutralized at pH 7.0 and incubated at 37 °C. A positive reaction elicited by a yellow zone surrounding the colony (Hofrichter 2002; Oliveira et al. 2009; Orth et al. 1993).

### **Bacteria growth and agar plate decolorization of Kraft pulping liquors**

In this experiment, three different Kraft pulping liquors (black, green and white), obtained from an Eastern Canadian paper mill were used. Colonies isolated from the same paper mill as described above were patched onto minimal media (Mm) agar plates (0.1 % NaNO<sub>3</sub>, 0.1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 % MgSO<sub>4</sub>, 0.1 % KCl, 0.05 % yeast extract and 1.5 % Bacto agar) supplemented with 5 % of each liquor (Negrão et al. 2015). All the tests were done at pH 12.0, the closest to real pH of pulping liquors, and incubated at 37 °C. Both the rate of colony growth and features (appearance and color) were recorded over the 5 days of incubation.

### **Bacteria decolorization of lignin-mimicking dyes**

Four different lignin-mimicking dyes, methyl blue (MB), methyl green (MG), remazol brilliant blue (RBB) and Chicago sky blue (CSB) were used in this study. Dye decolorization by the isolates was carried out according to Kiiskinen et al. (2004). Bacteria were picked onto Mm or LB agar plates (pH 7.0) supplemented with 0, 05 % (w/v) of the dye. The respective dye activity was visualized within 24-48 h of incubation at 37 °C. The appearance of a decolorized halo surrounding the colony indicated the dye degradation by the bacteria. The color of cell colony was also visually inspected to establish whether the dye had been absorbed by the colony rather than being degraded (Daizong et al. 2014; Wesenberg et al. 2003).

### **Identification of PHA producing bacteria**

PHA-producing bacteria were identified with two different staining methods using Sudan Black B (SBB) and Nile Blue A (NBA). For the first method, bacteria were grown on PHA Detection (PD) liquid medium (0.2 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.33 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.13 % MgSO<sub>4</sub>, 0.17 % citric acid, 2 % of glucose as carbon source and 10 mL/L of trace element solution) as described by Naheed and Jamil (2014). Media culture pH was adjusted to 7.0. After overnight incubation, 200 µl bacteria culture were re-streaked on PHA Detection Agar (PDA) as described in Gomaa (2014). After 24 h incubation at 37 °C, PHA

accumulation in cells was detected by SBB staining method. For this, 0.002 % SBB solution in 100 % ethanol was gently spread over the plates completely soaking them, and then the plate incubated at room temperature for 30-60 min (Rieger et al. 2002). The solution was then discarded, and the plate rinsed gently with 100 % ethanol. Colonies unable to incorporate SBB appeared white, while PHA producers appeared bluish black. All isolated which appeared to produce PHA were confirmed by NBA (Nile Blue A) staining according to Kitamura and Doi (1994).

### **PCR amplification of 16S rRNA gene and sequencing**

Genomic DNA was isolated from selected organisms by 2 heat shock cycles (15 min at -80 °C and 10 min at 100 °C). Amplification of 16S rRNA gene was performed using the universal primers 1522R (sequence 5'–3': AAGGAGGTGATCCANCCGCA), and 27F (sequence 5'–3': AGAGTTTGATCMTGGCTCAG). The PCR products were separated on a 0.8 % agarose low melting gel and the band corresponding to 1.5 kb 16S rRNA gene was purified using Qiagen MinElute PCR purification kit and then quantified. Purified PCR products were sequenced on both stands with an ABI Prism 3100 automatic sequencer at the Biomolecular analysis platform (University Laval, QC). Analysis of 16S rDNA sequences were performed using Clone Manager professional 7.0 (Sci Ed Centra). The resulting sequences searched against the nucleotide collection at Genbank database using BLAST with the BLAST algorithm using the non-redundant nucleotide database GenBank via the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (Kumar et al. 2002; Meddeb-Mouelhi et al. 2015).

## **Results and discussion**

### **Identification of bacterial strains from paper mill sludge samples**

Forty-one strains were tentatively identified based on their 16S rRNA gene sequences (Table 2). The majority were closely related to previously identified species (97-99 % DNA sequence similarity) and are identified as such. Others were more distantly related

(86-95 % DNA sequence similarity). The latter strains could represent new strains, different from the closest relatives listed in Table 2. Overall the strains aligned primarily within the phyla *Firmicutes* (61 %) and *Proteobacteria* (39 %) and encompassed eleven different genera. *Bacillus* and *Paenibacillus* species accounted for twenty-five of the total strains, with the remainder related to species in the genera *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Serratia*, *Rahnella*, *Pantoea*, *Citobacter*, *Klebsiella* and *Raoultella* (Table 2). One possible limitation of this work is that both the isolation media and approach utilized may have affected the final distribution of strains across these samples. Specifically, there remains the possibility of additional anaerobic and uncultivable bacterial strains associated with these samples.

**Table 2** Genetic identification of screened strains from paper mill sludges

Strains	Phylum	Genetic identification	% sequence identity
PS1	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus amylolequifaciens</i>	92
PS2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	99
PS3	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	92
PS4	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	92
PS4.2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	89
PS5	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	94
PS6	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	93
PS7	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus sp</i>	89
PS8	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	86
PS9	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	89
PS10	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99
PS11	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99
PS12	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	99
PS13	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus tequilensis</i>	89
PS14	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus sp</i>	92
PS15	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98
PS16	<i>Proteobacteria</i>	<i>Citrobacter sp</i>	98
PS17	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus sp</i>	98
PS18	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	98
PS19	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	98
PS20	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98



Strains	Phylum	Genetic identification	% sequence identity
PS21	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	89
PS22	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	86
MS1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Klebsiella sp</i>	97
MS2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Xanthomonas sp</i>	99
MS3	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pantoea sp</i>	98
MS4	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	95
MS5	<i>Proteobacteria</i>	<i>Serratia sp</i>	98
MS6	<i>Proteobacteria</i>	<i>Serratia sp</i>	98
MS7	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	98
MS8	<i>Proteobacteria</i>	<i>Raoultella terrigena</i>	98
MS9	<i>Proteobacteria</i>	<i>Raoultella terrigena</i>	98
MS10	<i>Proteobacteria</i>	<i>Serratia sp</i>	98
MS11	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	98
IS1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	98
IS2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rahnella sp</i>	95
IS3	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus sp</i>	98
IS4	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	98
IIS1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Aeromonas sp</i>	97
IIS2	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	98
IIS3	<i>Proteobacteria</i>	<i>Aeromonas sp</i>	98

Species within the genera *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Xanthomonas* have been found in paper mills in the USA, Finland, New Zealand and Canada to name a few (Beauchamp et al. 2006; Chiellini et al. 2014; Desjardins and Beaulieu 2003; Harju-Jeanty and Vaatanen 1984; Kämpfer et al. 2012; Schallmey et al. 2004; Martin 1988; Niemelä and Vääänen 1982). We found that the dominant genus in our mill was *Bacillus*, confirming previous biodiversity studies in pulp and slime samples from different Canadian paper mills (Desjardins and Beaulieu 2003; Maki et al. 2011). We also isolated species in the genera *Paenibacillus*, *Raoultella*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Xanthomonas* which have not previously been reported in earlier paper mill biodiversity studies. Differences in microflora also occurred among the sludge samples. Twenty-three strains originated from PS sludge, eleven from MS, and much fewer from the IS and IIS samples (4 and 3 strains respectively).

### **Morphological and physiological characterization of strains from paper mill sludge samples**

Strains were further characterized on the basis of colony morphology (colour, shape, margin, elevation and texture), cell morphology, Gram reaction, oxidase, and catalase activities (Additional file 1: Table S1). Twenty-one strains displayed oxidase and catalase activities, sixteen showed only catalase, and four strains only oxidase activity. Thirty-one strains were bacilli (rod-shaped) and stained Gram-positive. Ten strains were cocci and stained Gram-negative (see Additional file 1: Table S1). The majority of bacteria isolated from IS and PS were Gram-positive, whereas the majority of MS and IIS were Gram-negative.

All strains were tested for their ability to grow at various pH and temperatures. Among the strains, twenty-one grew at pH ranging from 6 to 10, while twelve strains grew at pH ranging from 7 to 10. The remaining eight strains grew only at neutral pH (Additional file 1: Table S2). Strains were also tested for their ability to grow at 50 °C. All of the strains isolated from PS grew at 50 °C at pH values up to 10, with the exception of strains PS5, PS7, PS12, PS15 and PS17 which grew only at neutral pH (Additional file 1: Table S2). Strains isolated from other environmental samples MS, IS and IIS were generally unable to grow at 50 °C, with the exception of two strains (MS1 and MS2).

While various *Bacillus* spp. were isolated from all of the sludge samples, they dominated the cultivable community from PS. The finding is not unexpected, as species within this genus have been detected in a wide range of environmental screening studies (Desjardins and Beaulieu 2003; Vaisanen et al. 1991). Furthermore, sludge samples contain a rich content of polymers (cellulose and hemicellulose), and PS being a combinational end-product is more concentrated than the IS and IIS sludge used to produce it and accordingly, revealed to be the most prolific medium regarding biodiversity.

### Hydrolytic activities associated with the bacteria screened from paper mill sludge

All strains were screened for seven different hydrolytic activities (CMCase, PASAase, xylanase, esterase, lipase, protease and amylase) (Table 3). Overall, twenty-one strains expressed extracellular cellulase (CMCase and/or PASAase). Among these, fourteen showed a preference for CMC, whereas four others preferred amorphous cellulose-rich PASA, and three strains PS1, PS5, and PS10 hydrolysed both CMC and PASA. The remaining twenty strains were xylanase positive and were primarily related to species in the genus *Bacillus*. Only four strains displayed both cellulase and xylanase activity. These were IIS1, IS3, PS21 and MS10, and were identified as *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* and *Serratia* sp. respectively.

**Table 3** Enzymatic activities of screened bacterial strains on agar plate with relevant substrate at 37 °C and pH 7

Strains	Genetic identification	Hydrolytic enzymes							Ligninolytic enzymes		
		Est	Lip	CMC	PASA	Xyl	Amyl	Prot	LiP	MnP	Lac*
PS1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
PS2	<i>Aeromonas salmonicida</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
PS3	<i>Paenibacillus</i> sp	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
PS4	<i>Paenibacillus</i> sp	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PS4.2	<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
PS5	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
PS6	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
PS7	<i>Bacillus</i> sp	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PS8	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
PS9	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
PS10	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
PS11	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
PS12	<i>Paenibacillus</i> sp	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
PS13	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
PS14	<i>Bacillus</i> sp	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
PS15	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PS16	<i>Citrobacter</i> sp	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PS17	<i>Bacillus</i> sp	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Strains	Genetic identification	Hydrolytic enzymes							Ligninolytic enzymes		
		Est	Lip	CMC	PASA	Xyl	Amyl	Prot	LiP	MnP	Lac*
PS18	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
PS19	<i>Pantoea sp</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PS20	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
PS21	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
PS22	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
MS1	<i>Klebsiella sp</i>	+	-	+					+		+
MS2	<i>Xanthomonas sp</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MS3	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
MS4	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
MS5	<i>Serratia sp</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
MS6	<i>Serratia sp</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
MS7	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MS8	<i>Raoultella terrigena</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MS9	<i>Raoultella terrigena</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
MS10	<i>Serratia sp</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MS11	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
IS1	<i>Rahnella aquatilis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
IS2	<i>Rahnella sp</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
IS3	<i>Bacillus sp</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
IS4	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IIS1	<i>Aeromonas sp</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
IIS2	<i>Paenibacillus sp</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IIS3	<i>Aeromonas sp</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

\*: Test done at pH5 for 7 days incubation

Est: esterase, Lip: lipase, CMC: CMCase, PASA: PASAase, Xyl: xylanase, Amyl: amylase, LiP: lignin peroxidases, MnP: manganese peroxidase, Lac: laccase, Prot: protease

Bacteria isolated from PS demonstrated either cellulose or xylanase activity, whereas those from MS strains were predominantly xylanolytic, with a few showing cellulase activity. Strains isolated from IS and IIS were better producers of cellulase than xylanase. Higher numbers of xylanase producers from MS likely reflect the abundance of xylan fibers in this particular environmental sample (Raj et al. 2013). All strains isolated from PS displayed extracellular esterase activity when grown on tributyrates agar plate except for strains PS15 and PS17. Nine strains (PS3, PS7, PS8, PS11, PS12, PS13, PS14, PS20

and PS22) identified as various *Bacillus* and *Paenibacillus* strains displayed both lipolytic activities (esterase and lipase). Fourteen strains isolated from PS showed no secreted lipase activity. Four strains isolated from samples taken from machinery (MS1, MS2, MS9 and MS10), three from IIS (IIS1, IIS2 and IIS3) and one from IS (IS1) were also esterase positive. No lipase activity was found in the strains isolated from MS, IS and IIS samples as shown in Table 3. The secretion of esterase observed here appears to be a consequence of PS particular composition, which includes wax esters. Most IIS and PS strains showed esterase activities, unlike those from MS and IS. Lack of lipolytic activities in MS sludge can be explained by its low content in extractible lipidous material.

Screening using agar plates supplemented with starch and casein revealed that 9 strains from PS (PS2, PS5, PS6, PS9, PS13, PS14, PS18, PS20 and PS22), one from MS (MS3) and one from IS (IS3) displayed both amylase and protease activities (Table 3). These strains were predominantly related to *Bacillus*. Twenty strains from various genera (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Serratia*, *Rahnella*, *Pantoea*, *Klebsiella* and *Raoultella*) were amylase and protease negative. We also found that only three strains (MS7, IIS1 and PS16) were amylase positive, and seven (PS1, PS4.2, PS10, PS11, MS5, MS9 and MS11) were protease positive. The finding that most strains produced esterase activity (twenty-nine), cellulase (twenty-two) and xylanase (twenty-three) was no real surprise. In fact, the majority of available substrate in this Kraft paper mill are triglycerides, wax esters, cellulose and hemicelluloses fibers (xylan) (Pervaiz and Sai 2012).

Isolates in the genus *Bacillus* are known for their diversity of enzymatic activities. The capacity of certain *Bacillus* strains to both produce and secrete a large array of extracellular enzymes made them among the most important industrial bacteria producing for enzymes [contributing to about 50 % of the total enzyme market (Adrio and Demain 2005; Fisher et al. 2014; Houde et al. 2004)]. In regard to all of the hydrolytic activities (hydrolase, glycosidase and protease), five strains isolated from PS displayed five of the seven hydrolytic activities which we tested for. These strains included *Bacillus subtilis* PS5, *Bacillus tequilensis* PS13, *Bacillus sp.* PS14, *Bacillus thuringiensis* PS20 and

*Bacillus subtilis* PS22 (Table 3). Overall, the variability in strain enzymatic profiles likely reflects differences in sludge composition or conditions, and adaptation of the microflora to each specific environment. Again, both the detection methods and substrates used for detection of enzymatic activities can impact the observed enzymatic profiles. For instance, in the case of enzymes that are not secreted, they would not likely be detected. Moreover, the limited number of substrates used here will not reveal all the potential enzymatic activities present in any given sample.

### Detection of ligninolytic enzymes

To further characterize biodiversity, we examined the ligninolytic potential of these strains. Ligninolytic enzymatic activities screened for including laccase (Lac), lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) (Hofrichter 2002; Kumar et al. 2008; Martínez et al. 2005). Twenty-two strains expressed at least one extracellular ligninolytic enzymatic activity (Table 3). Three strains (*Paenibacillus* sp. PS12, *Klebsiella pneumonia* PS4.2 and *Raoultella terrigena* MS9) produced all three activities, whereas nineteen strains showed none.

Strains isolated from PS sludge demonstrated the greatest number of extracellular ligninolytic activities compared to MS, IS and IIS where these activities were not detected. This may be due to both compositional and environmental differences among these sludges. In fact, the former contains organic matter such as cellulose, lignin and wood extracts (Negrao et al. 2015; Oyadomari et al. 2003) which make this sludge an optimal niche for ligninolytic enzymes producing bacteria. *Paenibacillus* strains have previously been identified in paper mill samples; however, unlike strains PS12, PS4, and IIS2, no enzymatic activity profiles were reported before (Kämpfer et al. 2012; Oliveira et al. 2009; Woo et al. 2014). *Xanthomonas* and *Pseudoxanthomonas* showed none of the three ligninolytic enzymatic activities (Lip, Lac and MnP). Interestingly as found with various hydrolytic activities, the *Bacillus* strains demonstrated a wide and variable range for this trait (Table 3).

### Decolorization and utilisation of pulping liquors as carbon source by bacteria

Strains were screened for their potential for bioremediation of black, green and white pulping liquors (Table 4). Growth was tested using Mm agar plates supplemented with pulp liquors as the sole carbon source (5 % v/v) at both pH 7.0 (data not shown) and pH 12.0, and temperature of 37 °C as previously described (Negrão et al. 2015). Thirty-two strains grew at pH 12.0 within 48 h on Mm medium containing pulping liquor(s) as sole carbon source (Chandra et al. 2011; Daizong et al. 2014; Wesenberg et al. 2003).

**Table 4** Detection of metabolic pathways with potential industrial applications

Strains	Dyes decolorization (pH7)				Mm + 5 % liquors (pH12)			PHA synthesis (pH7)	
	MB	RBB	MG	CSB	Black	Green	White	Sudan Black	Nile blue
PS1	D	D	+ <sup>a</sup>	W	+ <sup>a</sup>	+	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS2	+ <sup>a</sup>	-	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	-	-	-
PS3	D	-	-	D	-	+	+	w	P <sup>-</sup>
PS4	D	+ <sup>a</sup>	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	+	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS4.2	D	D	+ <sup>a</sup>	+	+ <sup>a</sup>	-	+	w <sup>-</sup>	P <sup>+</sup>
PS5	D	-	D	+ <sup>a</sup>	-	+	+	P <sup>+</sup>	P <sup>-</sup>
PS6	+ <sup>a,e</sup>	+ <sup>a,e</sup>	-	+ <sup>a</sup>	+	+	+	-	-
PS7	D	+ <sup>a,e</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	+	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS8	D	+ <sup>a</sup>	-	-	+ <sup>a</sup>	+	+	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS9	+ <sup>a</sup>	-	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS10	D	-	-	+ <sup>a</sup>	+	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS11	D	-	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	-	P <sup>+</sup>	P <sup>-</sup>
PS12	D	D	-	+ <sup>a</sup>	-	+	-	P <sup>+</sup>	P <sup>-</sup>
PS13	+ <sup>a</sup>	-	-	+ <sup>a</sup>	+	+	+	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS14	D	+ <sup>a</sup>	-	-	+	+	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS15	+ <sup>a</sup>	-	-	+ <sup>a</sup>	-	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS16	+ <sup>a</sup>	D	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS17	+ <sup>a</sup>	-	-	D	-	-	-	-	-
PS18	D	-	-	-	+	-	+	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
PS19	+ <sup>a</sup>	-	-	-	+ <sup>a</sup>	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>-</sup>
PS20	D	D	-	D	-	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>

Strains	Dyes decolorization (pH7)				Mm + 5 % liquors (pH12)			PHA synthesis (pH7)	
	MB	RBB	MG	CSB	Black	Green	White	Sudan Black	Nile blue
PS21	D	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	-	w	P <sup>-</sup>
PS22	D	D	-	-	-	-	-	w	w
MS1	D	W	+ <sup>a</sup>	D	+	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
MS2	D	D	-	-	-	-	+	-	-
MS3	D	+ <sup>a</sup>	+	D	+ <sup>a</sup>	+	+	P <sup>-</sup>	P <sup>-</sup>
MS4	D	D	+ <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-
MS5	-	+	-	D	+	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>-</sup>
MS6	D	+ <sup>a,e</sup>	W <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	-	+	+	-	-
MS7	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a,e</sup>	+ <sup>a</sup>	-	+	+	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
MS8	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	-	D	+ <sup>a</sup>	+	-	-	-
MS9	D	-	-	D	-	+	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
MS10	w <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	D	D	-	+	-	-	-
MS11	w <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	D	D	+ <sup>a</sup>	+	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
IS1	+ <sup>a</sup>	-	-	D	-	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
IS2	D	-	W <sup>a</sup>	+ <sup>a,e</sup>	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-
IS3	D	-	-	+	+ <sup>a</sup>	-	+	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
IS4	+ <sup>a</sup>	-	-	+ <sup>a</sup>	-	-	-	w	w <sup>-</sup>
IIS1	+ <sup>a</sup>	D	-	+ <sup>a</sup>	-	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
IIS2	D	+ <sup>a</sup>	D	D	-	-	-	P <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>
IIS3	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a,e</sup>	-	D	-	-	-	-	-

Superscript letter a: absorption; e: elimination

+, growth; -, no growth; w, weak growth; P<sup>+</sup>, PHA positive; P<sup>-</sup>, PHA negative; w, weak production of PHA; D, dyes degradation; RBB, Remazol Brilliant Blue; MG, Methyl Green; MB, Methyl Blue; CSB, Chicago Sky Blue

Twenty-four strains grew and decolorized medium containing black liquor. Black liquor contains a high content of lignin (>40 %) (Huang et al. 2007; Schallmeyer et al. 2004; Negrão et al. 2015), in addition to organic acids, and various polysaccharide degradation by-products (Martínez et al. 2005; Mathews et al. 2013). Among this group, fifteen strains in the genera *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pneumonia* and *Aeromonas* demonstrated the ability to adsorb the black color from the agar medium within 24 h, and eventually decolorize the compounds responsible for its dark colour (Table 4). This absorption/degradation phenomenon is similar to that reported by Bandounas et al. (2011). These strains were predominantly isolated from IS, PS and MS sludge.



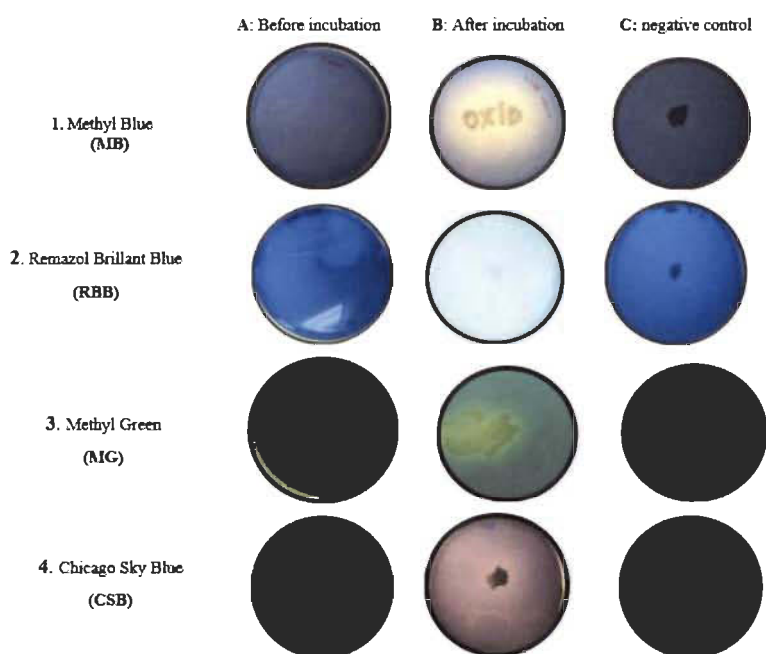
Twenty-two strains grew on Mm medium supplemented with 5 % green liquor (pH 12.0) within 24 h (Table 4). This liquor is a poor source for lignin (Van Dyke 2004). Certain strains (*Paenibacillus* PS12, *Raoultella* MS9 and *Serratia* MS10) grew on the green liquor but not on black or white liquors, suggesting that these strains are either adapted to a lower lignin content than the one found in black liquor or are inhibited by other compounds present in the black liquor.

White liquor is the poorest source of carbon among the three liquors, consisting primarily of inorganics ( $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NaOH}$  and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Only thirteen strains belonging to *Paenibacillus* strains PS3 and PS4, *Klebsiella* strains PS4.2, PS5, PS6, PS8, PS13 and PS18, *Bacillus* IS3, *Xanthomonas* MS2, *Pantoea* MS3, *Serratia* MS6 and *Pseudoxanthomonas* MS7 were able to grow on Mm agar plate supplemented with 5 % white liquor at pH 12.0 (Table 4). Certain strains (MS6, MS7, PS3 and PS5) which were unable to grow and stand high lignin concentrations found in black liquor were able to grow on the other liquors, while nine strains (PS15, PS17, PS20, PS22, IS1, IS4) and all IIS strains were unable to grow on any of the three liquors.

Five strains *Paenibacillus* PS4 and PS6, *Bacillus subtilis* PS8, *Bacillus tequilensis* PS13 and *Bacillus cereus* MS3 were able to grow on all the three liquors, suggesting a high degree of resistance to the compounds present in this material (phenolic compounds, organic and inorganic content) as well as the ability to metabolise components contained within. Bacteria isolated from IIS showed no growth on pulping liquor, while strains originating in IS showed a preference for black liquor whereas those from MS preferred green liquor. Finally, strains isolated from PS showed preference to black liquor and grew on green but had little affinity toward white pulping liquor. Clearly, a consortium of selected sludge bacterial strains might become the spearhead of an efficient lignin degradation strategy. In addition, they may also find application for decreasing color associated with black liquor, enhancing a number of paper mills' products.

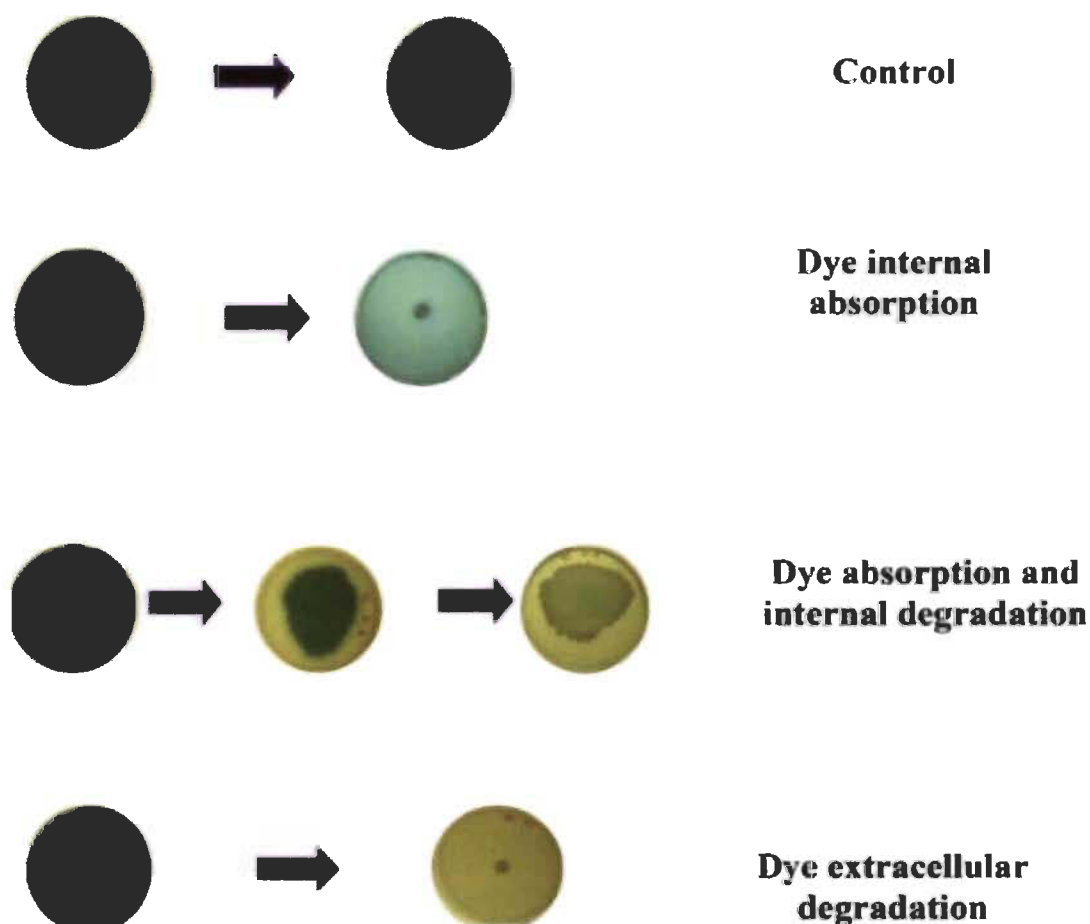
## Decolorization of industrial dyes by sludge bacteria

In order to address the use of these strain for potential use in bioremediation of industrial dyes we screened them on solid medium containing four different ligninolytic indicator dyes or synthetic lignin-mimicking dyes (0.05 % w/v): Methyl blue (MB), Chicago sky blue (CSB), Methyl green (MG) and Remazol brilliant blue (RBB; Figure 1). Ten strains decolourized all four dyes (Table 4). Among these *Paenibacillus* and *Bacillus* strains were the most efficient, decolourizing the dyes after only 24 h incubation (Table 4), in common with recently described abilities in related strains. The ability to degrade these dyes was not limited to specific genera, and various strains of *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Klebsiella* had this capability. Methyl blue (MB) and Chicago sky blue (CSB) are the most similar to lignin and were decolorized by most of the strains examined (Table 4). Much fewer strains were able to decolorize RBB and MG dye (twenty-two and fourteen strains respectively; Table 4). Furthermore, there was no strict correlation between the ability to decolorize industrial dyes and to grow on pulping liquors, suggesting that different pathways control these characteristics.



**Figure 1** Examples of isolated bacterial decolorization of dye-containing plates. Decolorization of 0.05 % dye-containing plates (1.MB, 2.RBB, 3.MG and 4.CSB) after 24 h incubation at 37 °C and pH7.

In fungi, decolorization of dye proceeds via three different mechanisms, as recently described by Blanca et al. (2007). These include (1) absorption and concentration of the dye (2) intracellular absorption and subsequent degradation of the dye and (3) extracellular degradation of dye. We observed similar mechanisms to decolourize these dyes with our strains (Figure 2).



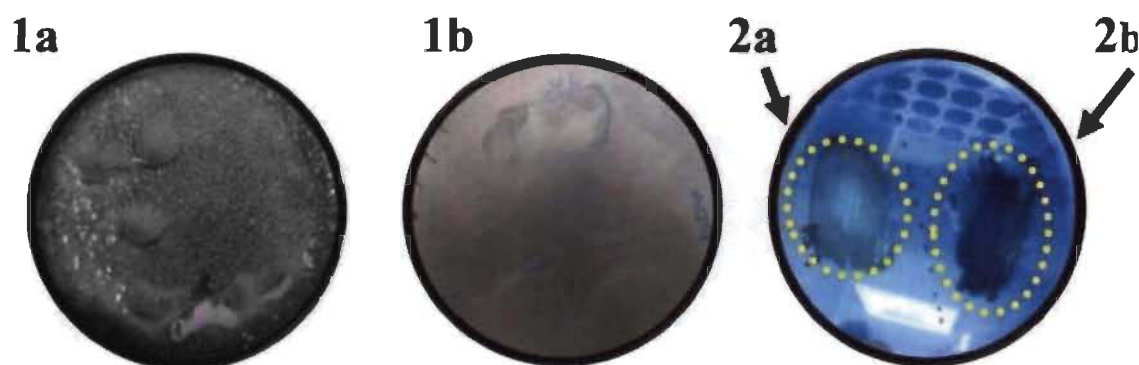
**Figure 2** Mechanisms of bacterial degradation of dye-containing plates.

This previous study showed that the dyes [they used dyes like RS (red) and 10B (blue)] could bind to the cells and then absorbed inside them. After intracellular compartmentation the dye could be eliminated. It was proposed that some proteins could play a role considering that such dyes are also known to bind to proteinaceous materials (Sahoo and Gupta 2005). In addition, the presence of an intact membrane improved the binding for most dyes. Thus, membrane proteins, intracellular compartments and

metabolic abilities may have an impact on dye binding and elimination, leading to different scenarios observed here.

### Bioplastic production by sludge microflora

Industrial waste like Kraft paper mill sludge may represent a potential source of feedstock used for bioplastic (PHA) production (Priest 1977; Satoh et al. 1999). Twenty-one of the isolated strains produced PHA as determined by staining with Sudan black B and Nile blue A (Figure 3), and the best producers included *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Pseudoxanthomonas* and *Aeromonas* (Table 4). Ten bacterial strains did not grow under our test conditions (PD agar, pH 7.0 and 37 °C) or produce any PHA (Table 4). Among all strains, those within the genera *Bacillus* and *Paenibacillus* showed the greatest degree of staining and may hold the best potential for production of PHA. *Klebsiella* is also known to produce PHA (Bandounas et al. 2011) and unlike the latter species does not form spores which could potentially make the extraction of intracellular PHA easier (Verlinden et al. 2007). As far as we are aware, *B. amyloliquefaciens* PS1 is the first strain of this species shown to produce PHA.



**Figure 3** Detection of bacteria producing PHA after Sudan Black B (1a, 1b) and Nile blue A (2a, 2b) staining. 1a PHA positive bacteria revealed with Sudan Black B staining. 1b PHA negative bacteria revealed with Sudan Black B staining. 2a PHA negative with Nile b.

## Conclusion

Bacteria represent an almost inexhaustible source for different industrial enzymes and offer advantages over other sources due to their rapid growth, moderate production costs, breadth of enzyme complexity, and biodiversity. Here, we have examined the readily cultivable bacterial community contained in Kraft paper mill sludge and assessed the potential of these isolates for industrial enzymatic applications. Microbial diversity and enzyme secretion were partially dependent on the sludge composition, where certain genera were found to be specific to the type of sludge sampled. For example, *Serratia* and *Raoultella* species were found only in MS, whereas species of *Rahnella* only in IS. Press sludge (PS) hosted the most diverse bacterial community, with many of these isolates tolerating extremes in both temperature and pH conditions (pH 12). In addition, PS strains also expressed the largest number of hydrolytic and ligninolytic enzymatic activities, a possible consequence of the dense and highly complex composition of PS sludge. Similarly, the bacterial community found in machine sludge (MS) was also quite diverse, although these isolates were devoid of xylanase activity, which may reflect the scarcity of xylan fibers in this type of sludge. A diverse range of *Bacillus* species encompassing a rich variety of enzymatic activities were associated with the four sludge samples used in this study. Most sludge types contained strains with ligninolytic activities, and the ability to decolourize lignin-mimicking dyes. Many of the isolated strains also grew on media containing Kraft pulping liquor as the sole carbon source. Regardless of the large difference in sludge composition, all strains had the ability to thrive in the presence of lignin or dyes mimicking lignin, indicating that this ability is fundamental for survival in such an environment. Finally, this study clearly demonstrates that bacteria found in a Kraft paper mill have a significant potential for use in industrial applications including bioplastics, stain control and bioremediation.

## **Acknowledgements**

Our heartfelt thanks to Dr. Martin Kalmokoff for his generous help in editing this manuscript. MB acknowledges financial support from NSERC (CRDPJ 44514), CRIBIQ and Buckman North America. MG was supported by a scholarship from Proteo.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Rights and permissions**

## **Open access**

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

## References

- Abhay R, Chandra R, Mohan M, Krishna R, Hemant JP, Atya K (2007) Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated bacterial strain *Aneurinibacillus aneurinilyticus* from the sludge of a pulp paper mill. *World J Microbiol Biotechnol* 23:793-799. doi:10.1007/s11274-006-9299-x
- Adrio JL, Demain AL (2005) Microbial Cells and Enzymes. A Century of Progress. In *Methods in Biotechnology. Microb Enz Biotransform.* 17:1-27
- Ai T, Jiang Z, Qiu Y, Dong X, Cui S (2003) New technology advance in soda recovery of pulp black liquors. *Hubei Papermaking* 4:36-39
- Apparao U, Krishnaswamy VG (2015) Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by a Moderately Halotolerant Bacterium *Klebsiella pneumonia* isolated from Rubber Plantation Area. *Int J Environ Bioremed Biodegrad.* 3:54-61. doi:10.12691/ijebb-3-2-3
- Arora and Sandhu D.S Arora, D.K Sandhu (1985) Laccase production and wood degradation by a white-rot fungus *Daedalea flavida*. *Enzyme and Microbial Technology.* 7:405-408
- Bandounas L, Wierckx NJP, Johannes H, Harald JR (2011) Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnol* 11:1472-6750. doi:10.1186/1472-6750-11-94
- Barr DP, Steven D (1994) Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Aust Environ Sci Technol*, 28:78A-87A. doi:10.1021/es00051a002
- Beauchamp CJ, Beaunoir AMS, Beaulieu C, Chalifour FP (2006) Confirmation of *E. coli* among other thermotolerant coliform bacteria in paper mill effluents, wood chips screening rejects and paper sludges *Water Res.* 40:2452-2462
- Bengtsson S, Werker A, Christensson M, Welander T (2006) Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour Technol.* 99:509-516.
- Blanca EB, Carlos C, Marquez MC (2007) Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes Pigments* 75:73-81
- Brahimi Horn MC, Lim KK, Liany SL, Mou DG (1992) Binding of textile azo dyes by *Mirothecium verrucaria*-Orange II, 10B (blue) and RS (red) azo dye uptake for textile wastewater decolorization. *J. Ind. Microbiol* 10:31-36

- Braunegg G, Bona R, Koller M (2004) Sustainable polymer production. *Polym-Plast Technol* 1:1779-1793
- CANMET Energy Technology Centre (2005) Pulp and paper sludge to energy preliminary assessment of technologies, Canada
- Chandra R, Abhishek A, Sankhwar M (2011) Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products. *Biores Technol.* 102:6429-6436
- Charbonneau DM, Meddeb-Mouelhi F, Boissinot M, Sirois M, Beauregard M (2011) Identification of Thermophilic Bacterial Strains Producing Thermotolerant Hydrolytic Enzymes from Manure Compost *Indian J Microbiol* 52:41-47. doi:10.1007/s12088-011-0156-8
- Chen GQ (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev* 38:2434-46
- Chiellini C, Iannelli R, Lena R, Gullo M, Petroni G (2014) Bacteria characterization in paper mill white water. *Bioresources* 9:2541-2559
- Crecchio C, Ruggiero P, Pizzigallo MDR (1995) Polyphenoloxidases immobilized in organic gels, properties and applications in the detoxification of aromatic compounds. *Biotechnol Bioengin* 48:585-591
- D'Souza T, Sharma D, Raghukumar C (2009) A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. *Mar Biotechnol.* 11:725-737
- Daizong C, Guofang L, Min Z, Song H (2014) Decolourization of azo dyes by a newly isolated *Klebsiella* sp. strain Y3, and effects of various factors on biodegradation. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 28:478-486. doi:10.1080/13102818.2014.926053
- Demain AL, Adrio JL (2008) Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. *Molec Biotechnol.* 38:41-55
- Desjardins E, Beaulieu C (2003) Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *J Ind Microb Biotechnol.* 30:141-145
- Dubé E, Shareck F, Hurtubise Y, Daneault C, Beauregard M (2008). Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Appl Microb Biotechnol* 79:597-603



- Erden E, Ucar CM, Gezer T, Pazarlioglu NK (2009) Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of Remazole Marine Blue. *Braz J Microb* 40:346-353
- Eriksson KE, Kirk TK (1994) Biopulping: an overview of developments in an environmentally safe paper making technology. *FEMS Microbiol Rev* 13:351-364. doi:10.1111/j.1574-6976.1994.tb00054.x
- Fariha H, Aamer AS, Sundus J, Abdul H (2010) Enzymes used in detergents: Lipases. *Afric J Biotechnol* 9:4836-4844
- Fisher AK, Freedman BG, Bevan DR, Sengera RS (2014) A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories. *Comput Struct Biotechnol J*. 11:91-99. doi:10.1016/j.csbj.2014.08.010 PMID: PMC4212277
- Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. <http://www.reportlinker.com/p0870778/Global-Markets-for-Enzymes-in-Industrial-Applications.html>
- Gomaa EZ (2014) Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol. *Braz Arch Biol Technol* 57:145-154
- Gupta R, Gupta N, Rathi P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:763-781
- Hardiman E, Gibbs M, Reeves R, Bergquist P (2010) Directed Evolution of a thermophilic beta-glucosidase for Cellulosic Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol* 161:301-312. doi:10.1007/s12010-009-8794-6
- Harju-Jeanty P, Vaatanen P (1984) Detrimental microorganism in the paper and cardboard mills. *Pap Puu* 3:245-259
- Hofrichter M (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) Enzyme. *Microb Technol*. 30:454-466
- Houde A, Kademi A, Leblanc D (2004) Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol* 118:155-170

- Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) (2001) Reference document on best available techniques in the pulp and paper industry. European Commission. Huang G, Jeffrey XS, Langrish TAG (2007) A new pulping process for wheat straw to reduce problems with the discharge of black liquor. *Biores Technol* 98:2829-2835
- Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) (2001) Reference document on best available techniques in the pulp and paper industry. European Commission, December. [http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/ppm\\_bref\\_1201.pdf](http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/ppm_bref_1201.pdf)
- Jaeger KE, Reetz TM (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16:396-403
- Kämpfer P, Falsen E, Lodders N, Martin K, Kassmannhuber J, Busse HJ (2012) *Paenibacillus chartarius* sp. nov., isolated from a paper mill. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62:1342-1347. doi:10.1099/ijs.0.035154-0.
- Karn SK, Kumar P, Pan X (2013) Extraction of lipase and protease and characterization of activated sludge from pulp and paper industry. *Prep Biochem Biotechnol.* 43:152-62. doi:10.1080/10826068.2012.712589
- Karn SKr, Chakrabarty SK, Reddy MS (2010) Pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas stutzeri* CL7 in the secondary sludge of pulp and paper mill. *J Environ Sci.* 22:1608-1612
- Kiiskinen LL, Ratto M and Kruus K (2004) Screening for novel laccase-producing microbes. *J Appl Microbiol* 97:640-646. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02348.x43
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.* 13:345-51
- Kitamura S, Doi Y (1994) Staining method of poly (3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue. *Biotechnol Tech* 8:345-350
- Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK, Lorito M (2001) *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J Plant Pathology.* 83:11-23
- Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmoll M, Seiboth B (2009) Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels* 2:1754-6834
- Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmoll M, Seiboth B (2009) Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol. Biofuels* 2:19-31

- Kuhad RC, Singh A, Eriksson KEL (1997) Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv Biochem Engin Biotechnol* 57:47-125
- Kumar A, Harrison PM, Cheung KH, Lan N, Echols N, Bertone P et al. (2002) An integrated approach for finding overlooked genes in yeast. *Nat Biotechnol* 20:58-63
- Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 35:377-391
- Liu L, Yang H, Shin HD, Chen RR, Li J, Du G, Chen J (2013) How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengin.* 24212-23. doi:10.4161/bioe.24761
- Maki ML, Broere M, Leung KT, W Qin (2011) Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int J Biochem Mol Biol.* 2:146-154
- Marcus Schallmeyer, Ajay Singh, Owen P Ward (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Rev Can Microbiol.* 50:1-17
- Martin CM (1988) Identification and implications of troublesome slime-forming bacteria found in paper mills. In: TAPPI Paper- makers Conference, TAPPI Press, Atlanta, pp 91-95
- Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol.* 8:195-204
- Mathews SL, Ayoub AS, Pawlak J, Grunden AM (2013) Methods for Facilitating Microbial Growth on Pulp Mill Waste Streams and Characterization of the Biodegradation Potential of Cultured Microbes. *J Vis Exp* 82:51373. doi:10.3791/51373
- Meddeb-Mouelhi F, Moisan JK, Beauregard M (2015) Characterization of Bacteria Community Isolated from Wood Decay. *British Biotechnol J.* 10:2231-2927
- Naheed N, Jamil N (2014) Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in *Enterobacter sp.* SEL2. *Braz J Microbiol* 45:417-426
- Nathalie B, Bopha Y and Lefebvre R (2015). From organic pollutants to bioplastics: insights into the bioremediation of aromatic compounds by *Cupriavidus Necator*. *New Biotechnol.* 32: 1871-6784. doi:10.1016/j.nbt.2014.09.003

- Negrão DR, Sain M, Alcides LL, Sameni J, Jeng R, Jesus JPF, Regina T, Monteiro R (2015) Fragmentation of lignin from Organosolv Black liquor by White rot fungi, bioresources. *BioResources* 10:1553-1573
- Niemelä SI, Väättänen P (1982) Survival in lake water of *Klebsiella pneumoniae* discharged by a paper mill. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:264-269
- Nigam PS, Pandey A (2009) *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*. Springer, Heidelberg. ISBN 978-1-4020-9941-0
- Nigam P, Singh D (1995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzym. Microb. Technol.* 17:770-778. doi:10.1016/0141-0229(94)00003-A
- Nigam PS (2013) Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules* 3:597-611. doi:10.3390/biom3030597
- Nigam VK, Singhal P, Vidyarthi AS, Mohan MK, Ghosh P (2013) Studies on keratinolytic activity of alkaline proteases from halophilic bacteria. *Int J Pharm Biol Sci.*4:389-399
- Oliveira PL, Teixeira Duarte MC; Ponezi AN; Durrant RL (2009) Purification and Partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*40:4S. doi:S1517-83822009000400012
- Orth AB, Royse DJ, Tien M (1993) Ubiquity of lignin degrading peroxidases among various wood degrading fungi. *Appl Environ Microbiol.* 59:4017-4023
- Oyadomari M, Shinohara H, Johjima T, Wariishi H, Tanaka H (2003) Electrochemical characterization of lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Molec Catal B: Enzym.* 21:291-297
- Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem.* 2:119-31
- Patil KJ, Chopda MZ, Mahajan RT (2011) Lipase biodiversity. *Indian J Sci Tech.*4:971-982
- Paye JMD, Lynd L, Guseva A, Hammer SK, Gjersing E, Davis MF, Davison BH, Olstad J, Donohoe BS, Nguyen TY, Wyman CE, Pattathil S, Hahn MG (2015) Biological lignocellulose solubilisation: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. *Biotechnol Biofuels.* doi:10.1186/s13068-015-0412-y
- Pervaiz M, Sai M (2012) Protein extraction from secondary sludge of paper mill wastewater and its utilization as a wood adhesive. *BioResources* 6:961-970

- Pokhrel D and Viraraghavan T (2004) Treatment of pulp and paper mill wastewater -a review. *Sci. Tot. Env.* 333:37-58
- Priest FG (1977) Bacteriological reviews. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus* American Society for Microbiology 41:711-753
- Raj A, Kumar S, Kumar Singh S, Kumar M (2013) Characterization of a New *Providencia* sp. Strain X1 Producing Multiple Xylanases on Wheat Bran. *Sci World J.* doi:10.1155/2013/386769
- Rehman S, Jamil N, Hasnain S (2007) Screening of different contaminated environments for polyhydroxyalkanoates producing bacterial strain. *Biologia, Sect. Cell. Mol. Biol.* 62:650-656
- Rieger PG, Meier HM, Gerle M, Vogt U, Groth T, Knackmuss HJ (2002) Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J Biotech* 94:101-123
- Sahoo DK, Gupta R (2005) Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent. *Process Biochem.* 40:1573-1578
- Satoh H, Mino T, Matsuo T (1999) PHA production by activated sludge. *International Journal of Biological Macromolecules* 25:105-109
- Sharyo MHHMYH (1993) The recent progress and general status of the lipase pitch control technology in Japan. *Jpn. Tappi J.* 47:41-51
- Singh M, Patel SKS, Kalia VC (2009) *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microb Cell Fact.* 8:38. doi:10.1186/1475-2859-8-38
- Singh NP, Prabhu KA (1986) Cellulase and ligninase production by basidiomycete culture in solid-state fermentation. *Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications.* Biomolecules 2013:3597-611
- Scopes RK (1982) Protein Purification: Principles and Practice. Springer-Verlag, New York.
- Nigam PS, Pandey A (2009) Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues. Springer, Heidelberg. ISBN 978-1-4020-9941-0, <http://public.eblib.com/EBLPublic/PublicView.do?ptiID=450886>

- Vaisanen OM, Mwaishumo NJ, Salkinoja-Salonen MS (1991) Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis. J Appl Microbiol 70:315-324
- Van Dyke Y (2004) Practical Applications of Protease Enzymes in Paper. The Book and Paper Group Annual 23:93 <http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/bpg/annual/v23/bp23-16.pdf>. Accessed April 20<sup>th</sup>, 2016.
- Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Khanna IR, Radecka I. (2007) Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. J Appl Microbiol. 102.6:1364-5072. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- Wang WL, Kang L, Lee YY (2010) Production of cellulase from kraft paper mill sludge by *Trichoderma reesei* rut C-30. Biochem Biotechnol. 161:382-94. doi:10.1007/s12010-009-8863-x
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology Advances 22:161-187
- Wesenberg D, Kyriakides I and Agathos SN (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnol Adv 22:161-187
- Wongwilaiwalin S, Rattanachomsri U, Laothanachareon T, Eurwilaichitr L, Igarashi Y, Champreda V (2010) Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. Enzyme Microb Technol. 47:283-290
- Wongwilaiwalin S, Rattanachomsri U, Laothanachareon T, Eurwilaichitr L, Igarashi Y, Champreda V (2010) Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. Enzym Microb Technol 47:283-290
- Woo HL, Utturkar S, Klingeman D, Simmons BA, DeAngelis KM, Brown SD, Hazen TC. (2014) Draft Genome Sequence of the Lignin-Degrading *Burkholderia* sp. Strain LIG30, Isolated from Wet Tropical Forest Soil. Genome Announc. 2:637-14. doi:10.1128/genomeA.00637-14
- Zhou S, Ingram LO. (2000) Synergistic Hydrolysis of Carboxymethyl Cellulose and Acid-Swollen Cellulose by Two Endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. J Bacteriol. 182:5676-5682

## Supplementary materials

**Table S1** Genetic identification of screened strains from paper mill sludges

Strains	Gram	Oxy	Cat	Bacillus/ Coccus	Spores	Form	Elevation	Shape	Size	Surface	Opacity	Texture	Color	Smell
PS1	+	+	+	bacillus	+	circular	high	irregular	big	rough	opaque	dry	cream	average
PS2	-	+	+	coccus	-	circular stretched	flat	irregular	average	smooth	opaque	frothy	cream	average
PS3	+	+	+	bacillus	+	circular	high	regular	average	frothy	not shiny	dry	white	strong
PS4	+	+	+	bacillus	+	circular stretched	little high	irregular	average	frothy	not shiny	dry	white	strong
PS4.2	-	+	+	coccus	-	circular	high	regular	big	smooth	shiny	creamy	dark brown	strong
PS5	+	-	+	bacillus	+	stretched	little high	irregular	big	dry wrinkled	opaque	dry	white	strong
PS6	+	+	+	bacillus	+	circular	high	regular	average	frothy	not shiny	dry	white	strong
PS7	+	+	+	bacillus	+	circular	high	irregular	big	frothy	not shiny	dry	white	strong
PS8	+	+	+	bacillus	+	circular stretched	high	regular	small	smooth	shiny	creamy	cream	average
PS9	+	+	+	bacillus	+	circular stretched	little high	irregular	average	frothy	not shiny	dry	white	strong
PS10	+	+	+	bacillus	+	stretched	flat	irregular	average	rough	not shiny	rough	white	strong
PS11	+	+	+	bacillus	+	circular	high	regular	average	smooth	opaque	frothy	white	light
PS12	+	+	+	bacillus	+	circular stretched	flat	irregular	average	rough	not shiny	frothy	white	strong
PS13	+	+	+	bacillus	+	stretched	flat	irregular	average	rough	not shiny	creamy	white	strong
PS14	+	+	+	bacillus	+	circular stretched	high	irregular	average	rough	not shiny	dry wrinkled	white	strong
PS15	+	-	+	bacillus	+	circular stretched	high	irregular	average	rough	opaque	granular	cream	low
PS16	-	+	+	bacillus	-	circular stretched	high	irregular	average	rough	opaque	granular	cream	strong
PS17	+	+	+	bacillus	+	circular	high	regular	small	smooth	shiny	smooth creamy	transparent	light
PS18	+	+	+	bacillus	+	circular	flat	irregular	average	rough	opaque	granular	cream	strong

Strains	Gram	Oxy	Cat	Bacillus/ Coccus	Spores	Form	Elevation	Shape	Size	Surface	Opacity	Texture	Color	Smell
PS19	+	-	+	bacillus	-	circular stretched	flat	irregular	average	rough	opaque	granular	cream	strong
PS20	+	+	+	bacillus	+	stretchcd	convex	irregular	average	rough	not shiny	dry wrinkled	White creamy	strong
PS21	+	-	+	bacillus	+	circular stretched	flat	irregularirregular	big	rough	opaque	granular	White creamy	strong
PS22	+	-	+	bacillus	+	circular	high convex	regular	average	rough	opaque	dry wrinkled	White creamy	light
MS1	-	+	-	bacillus	-	circular	high	regular	average	smooth	opaque	shiny	cream	strong
MS2	+	+	+	bacillus	+	circular	convex	regular	small	smooth	shiny	creamy	cream green	strong
MS3	-	+	+	coccus	+	circular	high convex	regular	small	smooth	shiny	creamy	cream	light
MS4	+	-	+	bacillus	+	circular	high	regular	average	smooth	shiny	creamy	cream	strong
MS5	-	-	+	coccus	+	circular	convex high	regular	small	smooth	shiny	bright	transparent	light
MS6	-	+	+	coccus	+	circular	high	regular	average	smooth	shiny	creamy	dark cream	light
MS7	-	-	+	coccus	+	circular	high convex	regular	very small	smooth	very shiny	creamy	transparent	strong
MS8	-	-	+	coccus	+	circular	high convex	regular	small	smooth	bright shiny	creamy	transparent	light
MS9	-	-	+	coccus	+	circular	high	regular	small	smooth	shiny	creamy	transparent	light
MS10	+	+	+	coccus	+	circular	high	regular	average	smooth	shiny	creamy	white cream	light
MS11	+	-	+	bacillus	+	circular	convex	regular	average	smooth	shiny	creamy	cream	strong
IS1	+	+	+	bacillus	-	circular	little high	regular	small	smooth	opaque	creamy	cream	low
IS2	-	+	+	coccus	-	circular	high	irregular	big	wrinkled	opaque	dry	cream	strong
IS3	+	+	+	bacillus	+	circular	high convex	regular	small	smooth	shiny	creamy	transparent	light
IS4	+	+	+	bacillus	+	circular	high	regular	small	smooth viscous	shiny	bright shiny	cream	strong
IIS1	-	+	-	bacillus	+	circular	high	regular	small	smooth	bright shiny	creamy	clear cream	strong
IIS2	+	+	-	bacillus	+	circular	high	regular	small	smooth	shiny	viscous creamy	cream	strong
IIS3	-	+	+	coccus	+	circular	high	regular	small	smooth	bright shiny	creamy	clear cream	light

Oxy: oxidase, Cat: catalase



**Tableau S2** Growth temperature and pH of bacterial strains isolated from the paper mill sludges

Strains	37 °C	50 °C
PS1	+ 6-10	+6-10
PS2	+7-10	+7-10
PS3	+6-10	+6-10
PS4	+6-10	+7-10
PS4.2	+6-10	+6-10
PS5	+6-10	+6-7
PS6	+6-10	+7-10
PS7	+7-10	+7
PS8	+6-10	+6-10
PS9	+7-10	+7-10
PS10	+6-10	+7-10
PS11	+6-10	+7-10
PS12	+7-10	+7
PS13	+6-10	+7-10
PS14	+6-10	+7-10
PS15	+6-10	+7
PS16	+6-10	+6-7
PS17	+6-10	+7-10
PS18	+6-10	+6-10
PS19	+7-10	+7-10
PS20	+7-10	+7-10
PS21	+6-10	+7-10
PS22	+6-10	+6-10
MS1	+6-10	+6-7
MS2	+6-10	+6-10
MS3	+7-10	-
MS4	+7-10	-
MS5	+7-10	-
MS6	+6-10	-
MS7	+6-10	-
MS8	+7-10	-
MS9	+7	-
MS10	+7	-
MS11	+ 7-10	-

Strains	37 °C	50 °C
IS1	+ <sup>7</sup>	-
IS2	+ <sup>7-10</sup>	-
IS3	+ <sup>7</sup>	-
IS4	+ <sup>7</sup>	-
IIS1	+ <sup>7</sup>	-
IIS2	+ <sup>7</sup>	-
IIS3	+ <sup>7</sup>	-

Le chapitre III contient une étude de la biodiversité d'un autre type de substrat qui est les huiles usées de moteurs provenant de Phoenix environnement, Québec. Dans ce chapitre, on essayera d'élucider le potentiel enzymatique de ces bactéries ainsi que leurs applications industrielles.

## CHAPITRE III

### DEGRADATION OF USED ENGINE OIL ALKANES BY ITS INDIGENOUS BACTERIA, PRODUCTION OF PHA AND SECRETION OF AN ELASTOMER-LIKE BIOPOLYMER

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans  
la revue *International journal of science and research*, 2018.

**Manel Ghribi<sup>1,2,3</sup>, Fatma Meddeb-Mouelhi<sup>1,2,3</sup>, Marc Beauregard<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup> CRML, Centre de Recherche sur les Matériaux Lignocellulosiques C.P. 500,  
Trois-Rivières (Québec), G9A 5H7 Canada

<sup>2</sup> Université du Québec à Trois-Rivières

<sup>3</sup> PROTEO, Université Laval

#### 3.1 Contribution des auteurs

MG, FM et MB ont planifié le travail expérimental. MG et FM ont échantillonné et géré les souches signalées ici. La caractérisation a été réalisée par MG le projet initial a été préparé par MG et édité par FM et MB qui ont effectué les dernières corrections du manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale manuscrit.

### 3.2 Résumé de l'article (français)

Il a été démontré que les microbes s'adaptent à des environnements extrêmes et développent la capacité d'utiliser divers substrats. Dans cette étude et en collaboration avec une entreprise de recyclage d'huiles locale (Québec, Canada), nous avons évalué la biodiversité des bactéries et étudié leur capacité à métaboliser les huiles usées de moteur (UEO). Les espèces bactériennes identifiées (*Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Stenotrophomonas*) étaient similaires à celles retrouvées dans d'autres pays ailleurs dans le monde, y compris dans des pays au climat plus chaud que le Canada (comme la Chine, l'Inde et l'Égypte, par exemple). Cela suggère que l'UEO en tant que principale source de carbone, le facteur déterminant de la biodiversité des sites de collecte des huiles usées de moteur. De nombreuses souches bactériennes identifiées dans cette étude ont résisté à des concentrations supérieures des UEO (20% v/v) si on les compare à ce qui était rapporté précédemment dans la littérature. Ces bactéries criblées à partir de cette source d'UEO étaient capables de produire un biopolymère intracellulaire qui a été identifié comme un polyhydroxyalcanoate (PHA). Nous avons également identifié un consortium intéressant (composé de *Stenotrophomonas* et de *Rhodococcus*) qui métabolise les alcanes UEO et semble convenir à deux applications: la biorestauration et la production de biopolymères. Dans des conditions spécifiques, ce même consortium bactérien a sécrété un biopolymère de type élastomère. Le biopolymère s'est formé à la surface des cultures de bouillon où il a été facilement récupéré. Sur la base des analyses FTIR, le biopolymère a été provisoirement identifié comme étant un monomère d'éthylène propylène diène (un caoutchouc EPDM). À notre connaissance, la conversion de l'UEO en un élastomère extracellulaire par des bactéries n'a jamais été rapportée. Les deux espèces se sont avérées nécessaires à la production de ce biopolymère, suggérant une synergie entre leurs mécanismes métaboliques respectifs.

### 3.3 Article complet (anglais) : Degradation of used engine oil alkanes by its indigenous bacteria, production of PHA and secretion of an elastomer-like biopolymer

#### Abstract

Microbes have been shown to adapt to extreme environments and to develop the ability to use various substrates. Here in collaboration with a local oil recycling company (Québec, Canada), we assessed the biodiversity of bacteria and studied their ability to metabolize used engine oil (UEO). The bacterial species identified (*Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and *Stenotrophomonas*) were similar to those found elsewhere in the world, including countries with much warmer climate than Canada (like China, India, and Egypt to name a few). This suggests that UEO as main carbon source -and not climate- is determinant for the biodiversity in UEO collection sites. Many bacterial strains identified here resisted to exposure to UEO at higher concentration (20% v/v) than reported earlier. As observed in earlier reports for many bacteria under various growth conditions, bacteria screened from this UEO source were also able to produce an intracellular biopolymer that was identified as a Polyhydroxyalkanoate (PHA). We also identified an interesting consortium (composed of *Stenotrophomonas* and *Rhodococcus*) that metabolized UEO alkanes and appeared suitable for two applications: bioremediation and biopolymer production. Under specific conditions, this same bacterial consortium secreted an elastomer-like biopolymer. The biopolymer formed at the surface of broth cultures where it was easily recovered. Based on FTIR analyses, the biopolymer was tentatively identified as ethylene propylene diene monomer (an EPDM rubber). To our knowledge, the conversion of UEO into an extracellular elastomer by bacteria has not been previously reported. Both species were found to be necessary for production of this biopolymer, suggesting a synergy among their respective metabolic machinery.

**Keywords:** used engine oil, bacteria, biopolymer, PHA

## Introduction

The intensive use of petroleum hydrocarbon products, such as diesel and engine oil, can lead to unintentional soil pollution via leakage or dispersion, and represents a major environmental problem. In most countries, oil spills at auto-mechanic workshops have been left un-remediated for the last hundred years, and the hazards associated with the continuous accumulation of petroleum products in this environment remains a serious concern.

The Environmental Protection Agency (EPA) defines used oil as any oil that has been refined from crude petrochemical oil, or any synthetic oil, that has been already used. Here, we defined used engine oil (UEO) as any petroleum-based or synthetic oil that has been used and degraded by heat and mechanical stress in combustion engines [1]. The result of such use has several consequences, including contamination by physical or chemical impurities.

During engine operation, lubricants are modified by both chemical and physical actions, as a consequence of the high temperature and heavy mechanical shear. After usage, engine oil contains a wide variety of new substances. In fact, engine oil is chemically transformed by oxidation, nitration, cracking of polymers and decomposition of metallic compounds. In addition to physically degraded and shortened hydrocarbon chains, UEO contains different contaminants such as organo-metallic compounds whose synthesis is made possible via atmospheric dust, metals, metal oxides and combustion products [2] [3]. Waste engine oil also contains other contaminants such as alkyl benzenes, naphthalene, methylnaphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The presence of these compounds makes UEO one of the most polluting, toxic, and dangerous waste products existing on Earth [4] [5]. Furthermore, due to its ability to form thin films over large surfaces of water, oil spills have harmful consequences for the life forms associated with aquatic environments [6].

The importance of reducing oil spills of any size is now widely recognized, and many countries have imposed regulations and procedures for collecting used oils [7]. In addition,

extensive research efforts aimed at minimizing the environmental consequence of oil spills have been developed using chemical, physical and natural processes. Such pollution control methods include: bioremediation (use of microorganisms to degrade pollutants); phytoremediation (use of plants to clean pollutants by bioaccumulation into the plant's tissues), chemical modifications, dispersion (using surfactants), and for large spills, containment at surface (with floating barriers). Among these approaches, decontamination using bacteria has been a successful approach to remediate many pollutants.

Bacteria have shown their value for the treatment of industrial wastewater [8], production of industrial enzyme [9], bioconversion of substrate to value-added products [10], and other applications such as the treatment and biodegradation of tire rubber and related compounds [11].

Previous works on hydrocarbon-degrading microorganism showed that different microbes such as fungi and bacteria (*Brevibacterium* and *Bacillus* to name a few) were common in most biological-based treatments. The indigenous microbes found in used oil environments (garages or recycling plants) also represent a high potential for remediation in terms of their adaptation to locally available carbon sources such as cyclic and linear hydrocarbons found in used oil. In fact, most of the previously described micro-organisms were isolated from contaminated motorcycle workshop or petrochemical refinery soils [12] [13] [14]. Various fungi such as *Aspergillus niger*, *Penicillium documbens*, *Cochliobolus lutanus* and *Fusarium solani* biodegrade crude oils [13]. *A. niger* was shown to be very active for degradation of different kinds of oil compounds and was the most efficient metabolizer of in the study of Nasrawi 2012 [15]. The hydrocarbon biodegradation ability of many other microorganisms has been reported over the years [16][17]. Importantly, the use of microorganisms has an advantage over chemical approaches in terms of not introducing additional chemicals into the environment.

Currently, UEO are seldom used as substrates or starting materials for synthesis of value-added products. For instance, they can be used as low-cost additive for tar and mixed with asphalt for road construction or repair [7]. Another interesting fate for UEO



involves its conversion to diesel [18]. However, this operation is associated to time consuming pre-treatment (chemical filtrations and blending process) and the yield of produced diesel is still low. Unfortunately, in Canada, most UEO ends up being burned in heat generating equipment [19].

The use of microbes to convert UEO into valuable products could represent a more effective use of this common waste product. Several bacteria have been shown to metabolize nutrients in industrial and municipal wastewaters for production of industrially relevant enzymes [20] [11]. Other laboratories have reported the production of bioplastics such as PHA or PLA by microbes using hydrocarbons as substrate [21] [22].

Obviously, such microbes should thrive in UEO collection sites where hydrocarbons are in essentially an unlimited supply.

Here, we have isolated different species of bacteria sampled from a number of surfaces such as containers, machines, floors, soils samples on the premises of an important East Canada UEO collecting site. These bacteria were characterized and identified based on morphology, biochemical and genetic analysis. The biodegradation potential of these strains was explored, both individually and in mixed cultures. Finally, we studied their ability of converting used oil carbon into biopolymers of value. As far as we know, this is the first microbiology study done on UEO in Canada with focus on bioremediation and biopolymer production.

## **Materials and methods**

### **Used engine oil sampling**

Different samples of UEO were collected at a local recycler (Phoenix Environment, QC, Canada). Sites for samples collection included the main UEO reservoir, a contaminated plastic waste container, and from the surfaces of several machines and equipment located at the production site. The samples were collected in plastic Ziploc bags and/or in Falcon

tubes under aseptic conditions. All samples were identified according to location, and stored at 4 °C.

### **Isolation and growth of bacteria from UEO samples**

Isolation of bacteria contained within each UEO sample was performed as followed: 10g UEO was diluted in 100 mL of saline water (0.85% NaCl), mixed by vortexing, and incubated for 1 h at room temperature (RT), then filtered through a sterile filter paper to remove solids. A 500µL aliquot of filtrate from each UEO sample was spread on LB media and minimum media (Mm) agar plates (0.1% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.1% KCl, 0.05% yeast extract and 1.5% Bacto agar) supplemented with 10% UEO (final concentration, UEO was collected on site). Since the water extracted from bulk UEO had a pH ranging from 6 to 7, the pH of media was adjusted to 7.0 which we assumed should allow for growth of most bacteria present. Plates were incubated at 37 °C for a minimum of 48 h, or until visible colonies were present. Following incubation, colonies having macroscopically different morphologies were picked from each plate and re-streaked onto LB agar media to obtain pure cultures. For long term storage, isolates were grown overnight in 10 mL LB medium (pH 7.0) with agitation (230 rpm). A 1 ml aliquot was mixed with glycerol (30% v/v final concentration) and stored at -80 °C.

### **Morphological identification and biochemical characterization**

For each isolate the colony characteristics (i.e. cell morphology) and Gram stain reactions were determined. Catalase and oxidase activities were also determined as previously described [23] (Table S2).

### **PCR amplification of 16S rRNA gene and sequencing**

In order to identify the isolated bacteria, genomic DNA was purified from each isolate by performing 2 cycles of heat shock (15 min at -80 °C and 10 min at 100 °C). In some cases where genomic DNA was not obtained, a TransDirect Animal Tissue

PCR KIT (Biocivic#AD201) was used as an alternative. Amplification of 16S rRNA gene was performed using the following universal primers: 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCGCA-3') and 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'). The PCR products were separated and visualized on a 0.8% agarose low melting gel and the bands corresponding to 1.5 kb 16S rRNA gene were purified using Qiagen MinElute PCR purification kit and then quantified by measuring OD at 260 nm using a Biotek plate-reader (Take 3 DNA quantification application). For DNA sequencing, quantification of purified PCRs was verified again on 0.8% agarose gel. Sequencing of the 16S rRNA genes with the primers described above (27F and 1522R) was performed using ABI Prism 3100 automatic sequencers at the Biomolecular analysis platform (University Laval, QC).

For a formulated bacterial consortium, the abundance of individual constituents was performed by first cloning the community 16S rRNA genes. For this, bacterial culture was prepared, and total genomic DNA was extracted with Favor Prep Soil DNA kit (#FASOI 000-Mini Kit from Biocivic). Then PCR amplification was carried out using the G7 primer mix and PCR fragments were ligated into pEasy-Blunt zero vector and then transformed into TransI-T1 competent cells (Biocivic#CB501-01). Transformed cells were plated onto LB-agar plate containing 100 µg/ml ampicillin and then incubated at 37 °C for overnight. Transformant plasmid was isolated from ten colonies and sequenced for 16S rRNA gene analysis.

The 16S rDNA sequences analysis of were performed using Clone Manager professional 7.0 (Sci Ed Centra) and verified by Blast2Go software. The resulting sequences were compared to the Genbank non-redundant nucleotide database using NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information (NCBI) website) [23] [24].

### **Tolerance of bacteria to UEO high concentration**

Isolates were tested for their ability to grow in presence of UEO. Each isolate was spread on Mm media agar (described in section 2.2) supplemented with up to 20% (v/v) of UEO

and incubated for 3 days at 37 °C. Bacteria growing within the indicated incubation time were identified as being highly tolerant to UEO.

### **Chemical analysis of the UEO**

Duplicate samples of UEO were analyzed to determine the chemical composition (e.g. available alkane), compound structures, and their percentages.

### ***TGA***

Thermo Gravimetric Analysis (TGA) experiments were undertaken three times at different temperatures and aging intervals with a Machine Universal v4.5A (TA Instruments) with ~2 mg of oil under nitrogen atmosphere at a flow rate of 100 mL min<sup>-1</sup>. Four different sample-heating rates (5, 10, 20 and 50 °C min<sup>-1</sup>) were chosen in order to evaluate the thermal stability of UEO and kinetics of ageing. All samples were heated from ambient temperature to 600 °C. The ageing experiments were performed in presence of air.

### ***FTIR***

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to determine the chemical composition of the UEO. The spectra were recorded using transmission mode with cell path lengths ranging from 0.1126 mm to 0.1173 mm and normalized to a constant path-length prior to data analysis.

### ***NMR Spectroscopy***

NMR experiments were carried for analysis of UEO. Deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) was added to 5 ml of oil sample which was then positioned in a JEOL Eclipse +400 NMR instrument. NMR data and spectra were processed using the Delta NMR processing and control software version 3.1.

### ***GC-MS/FID***

Hexane extracts (1.0 L) of residual waste engine oil were analyzed with a Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph equipped with a 30-m long HP-5 column (internal diameter, 0.25 mm; film thickness, 0.25 mL) and a flame ionization detector (FID). Nitrogen was used as carrier gas. The injector and detector temperatures were maintained at 250 and 350 °C respectively. The column temperature was programmed to ramp from 60 to 500 °C for 27 min.

### **Monitoring degradation of alkanes by FTIR**

A bacteria consortium was formulated by mixing equal proportions (OD at 600 nm) of pure bacterial cultures that were isolated from UEO samples. A preliminary evaluation of the capacity of the formulated consortium to degrade petroleum hydrocarbons was conducted using Mm liquid medium supplemented with 1% (v/v) of UEO. Unsterilized UEO was added to the medium and then emulsified for 15 min in order to achieve a homogenized solution. The medium (200 ml) was inoculated and placed under four different conditions:

- 1) Mm media supplemented with 1% of UEO pH 7, incubated at 37 °C without agitation
- 2) Mm media supplemented with 1% of UEO pH 7, incubated at 37 °C with agitation at 180 rpm
- 3) Mm media supplemented with 1% of UEO pH7, incubated at room temperature (RT) without agitation and
- 4) Mm media supplemented with 1% of UEO pH7, incubated at RT with agitation at 180 rpm.

Negative controls (non-inoculated) were run under the same experimental conditions. Cultures were monitored weekly for up to 7 weeks and examined for the loss of UEO-associated dark color. FTIR was used to ascertain the decrease and/or the disappearance of chemical compounds in the UEO by the bacteria consortium. For this, a sample of each

culture (500  $\mu$ l) was centrifuged for 15 min (5000 g). One drop from each supernatant was used for FTIR spectroscopy.

### **Production and analysis of extracellular bacterial biopolymer**

The ability of the formulated bacterial consortium to produce biopolymers was investigated. For this, bacteria were incubated at room temperature in Mm media supplemented with 1% UEO at pH 7 without agitation for several days. Different methods were then used for analysis of biopolymers.

#### ***FTIR biopolymer analysis***

FTIR spectroscopy was used to monitor the degradation of UEO under the various culturing conditions and to analyze the extracellular biopolymer produced by the bacterial consortium. For the analysis of the biopolymer, a section (0.5 x 1 cm) was cut from the pellicle and washed 5 times with 2 mL hexane, then 3 times with 2 mL acetone and final with water. The polymer was left to dry for 4 hours under vacuum and FTIR spectra were recorded with FTIR Thermofisher instrument (model Nicolet iS10). The sample was exposed to irradiation in reflectance mode in the range of 500 to 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### ***SEM-EDS analysis of extracellular biopolymer***

Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectrometry (EDS) were performed on biopolymers after drying overnight at 50 °C. The 0.5 X 1 cm biopolymer sample was then applied onto a double face adhesive tape and then placed in the SEM microscope. SEM-EDS imaging was performed with a Hitachi SU1510 microscope, EDS attached to the detector oxford x-Max 20  $\text{mm}^2$  and AZtec software was used for element analysis.

## Detection of Polyhydroxyalkanoate (PHA) bacterial production

Bacteria isolated from UEO were tested for their ability to produce PHA using two different staining methods: Sudan Black B (SBB) and Nile Blue A (NBA) as described by [9].

## Results

### Analysis of UEO

**Table 1:** UEO composition

<i>Compounds and proportions</i>	<i>Composition</i>
<b>Non-volatile, 78%</b>	Linear Alkanes: C <sub>10</sub> to C <sub>40</sub> Dibutyl-phthalate Bis-(2-ethylhexyl) -phthalate
<b>Volatiles, 17%</b>	Toluene Undecane Ethylbenzene 1,3-Dimethylbenzene 1-ethyl-3-methylbenzene 1,2,3-trimethylbenzene 1-ethyl-4-methylbenzene Mesitylene 2-butoxy-ethanol Trimethyl-bicyclo 2.2.1 hept-2-yl acrylate
<b>Heavy compounds (high molecular weight), 4%</b>	Not analyzed
<b>Minerals, 1%</b>	Not analyzed

UEO samples were provided by the Phoenix Environment staff and analyzed using analytical chemistry techniques (GS-MS/FID, TGA and NMR). TGA results pointed to four groups of molecules in UEO: Volatiles (25 °C to 159 °C), non-volatiles (heavy) (159 °C to 383 °C), molecules (383 °C to 500 °C) and minerals (500 °C to 800 °C).

Based on these analyses we estimated that 17% of UEO consisted of volatile compounds, 78% non-volatile compounds, 4% heavy compounds and 1% minerals.

The NMR spectra were characterized by intense peaks that were located in the region of 0 to 2 ppm which usually correspond to carbon-hydrogen bonds found in alkanes. In combination with the GC-MS/FID, results confirmed that most molecules found in UEO are alkanes (Additional file: Figure S1, S2 and S3). In the non-volatile fraction, alkanes were predominantly linear of lengths ranging from C10 to C40. Among these, we found two predominant molecules; dibutyl phthalate and bis-(2-ethylhexyl) phthalate (Table 1). The volatile fraction was predominately composed of phenolic compounds like toluene, and ethylbenzene (Table 1). As expected, the heavy compounds fraction contains very little volatile products. Given the nature of the sample, it can be assumed that they are alkanes with chain lengths between C40 and C50. (Additional file: Figure S1, S2 and S3). One might expect that chemical composition of UEO may vary depending on the original crude oil depending the processes used during refining, the efficiency and type of engine it was used in, the gasoline combustion products, the additives added to the fuel and the length of time that the oil remains in the engine [5]. The analysis presented in Table 1 is in general agreement with previous analyses of UEO despite differences in origins and use [25].

### **Morphological and biochemical characterization of bacteria isolated from UEO**

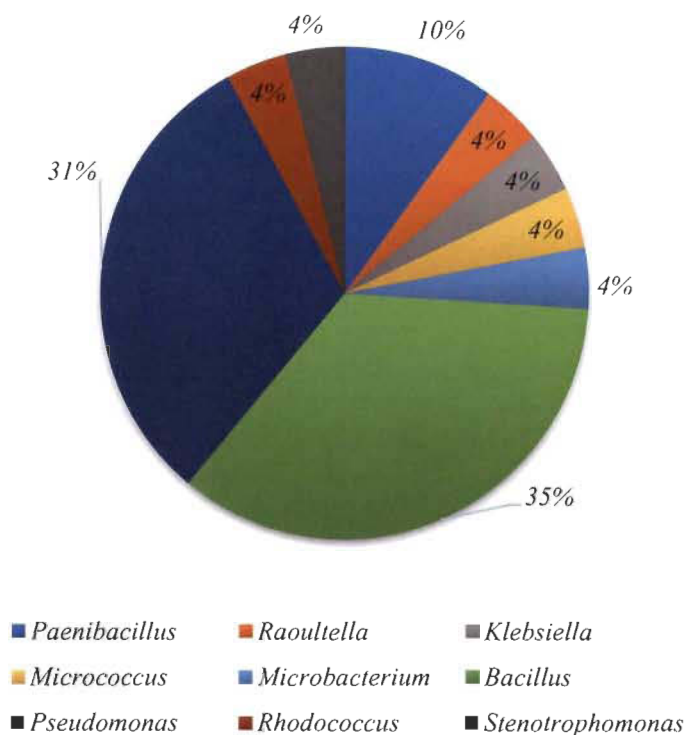
Fifty-five bacterial strains were isolated from the UEO samples collected from various surfaces across the oil collection site. All bacterial strains were characterized using standard methods including morphology, Gram-stain, detection of oxidase, catalase activities and ability to grow at different pH (Additional file: Table S1). Bacterial cell morphology showed that thirty-six strains had bacilli rod shaped form, that six out of fifty-five were coccobacilli while the remaining strains were cocci. Twenty-four strains displayed oxidase and catalase activities, twenty-two showed only catalase and the rest displayed oxidase activity. Approximately half of the bacterial strains isolated were Gram-positive (Additional file: Table S1). Most isolates (31/55) had the ability to grow



over a wide pH range (pH 6 to 12), while eleven strains could only grow at pH 7. These 11 bacterial strains belong to the genera *Micrococcus* and *Klebsiella*.

### **Bacteria identification by analysis of 16S RNA gene sequences**

The amplified 16S rRNA sequences were analyzed using BLASTN available on NCBI portal. Bioinformatic analysis of the 16S rRNA gene sequences (from bacteria collected from UEO) revealed DNA sequence similarity with nine bacterial species (*Paenibacillus*, *Raoultella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*) as shown in figure 1. Among these, *Bacillus* and *Pseudomonas* species accounted for 66% of all strains isolated from the site. This result is consistent with previous studies showing that *Pseudomonas spp.* can degrade linear alkanes having medium length chains ranging from C<sub>20</sub>–C<sub>34</sub> [26] [27], while *Bacillus* species were found to degrade linear alkanes ranging from C<sub>9</sub> to C<sub>30</sub> [28] [29]. The presence of *Arthobacter sp* on diesel contaminated sites was reported earlier [30] [31] but was not found here. In regards to *Microbacterium*, this genus was previously detected in soil containing fluoranthene and was recently isolated from crude oil in a Chinese oilfield [32]. Other bacteria species such as *Micrococcus* were also found on used engine oil contaminated sites in India [33] [34]. In general, the range of genera isolated here, are similar to those from UEO from South Africa, Saudi Arabia, India, Egypt and China (see above-cited studies) despite the profound differences in climatic conditions comparing to Canada. This observation suggests that bacterial species populating UEO are determined by availability and specificity of UEO substrates, rather than climatic conditions such as average temperatures. One possible limitation of this work is that both the isolation media and approach utilized may have affected the final biodiversity of strains found in the sampled UEO. Many other strains, including anaerobic and uncultivable bacterial strains, might be detected under different culture conditions.



**Figure 1:** Percentage of bacterial strains with 16S DNA sequences similarity to known genera. All bacteria grown after sampling at the UEO recycling site had a high degree of sequence homology (97% to 99%) to known bacteria.

### Bacterial resistance to high concentration of UEO

Certain isolates were better adapted to UEO and survived following exposure to a high concentration. Six out of 55 strains continued to grow despite the presence of 20% (v/v) UEO dispersed in growth medium. Most of the strains found on site (26 bacteria) were able to grow on agar plate supplemented by up to 20% of UEO (pH 7, 7 days growth). As previously mentioned, some specific species of bacteria can degrade alkanes, benzene, toluene or naphthalene as carbon and/or energy sources [15] [35]. But here, we tested the isolated bacteria for their resistance to all petroleum contaminants contained in UEO.

Isolates able to grow in the higher concentration of UEO were mainly *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* and *Microbacterium* species while the other genera (*Klebsiella*, *Micrococcus*, *Raoultella* and majority of *Paenibacillus*) did not tolerate 20% UEO in the medium (Additional file: Figure S7 and S8). Earlier studies have

reported on bacteria resistant to the individual components of UEO, whereas others also used UEO but at lower concentrations [36]. For example, some have reported the growth of bacterial strains in single compounds (such as pyrene or fluorene) from UEO or diesel [34][37][38]. To our knowledge, the ability of a large portion of our isolates to grow on medium containing 20% UEO is higher than reported in previous similar studies [37].

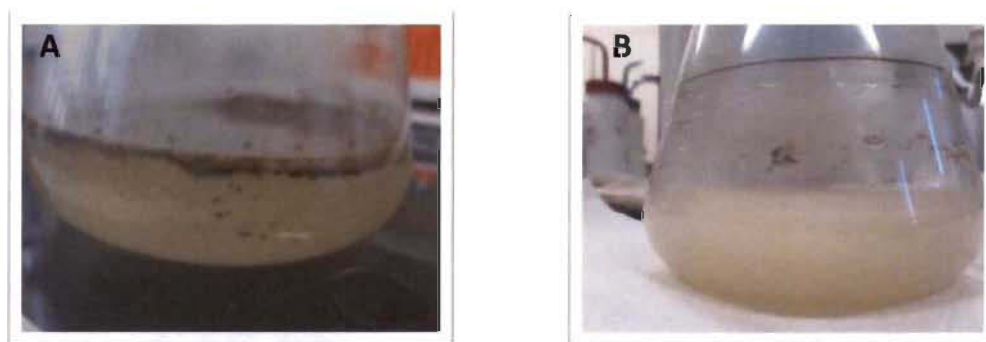
### **PHA detection in bacteria screened from used engine oil**

UEO could be a potential source of feedstock for bioplastic (PHA) production. Twenty-three strains studied here produced PHA as determined by staining with Sudan black B and Nile blue A (Additional file: Figure S5 and S6). They were identified as strains of *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas* and *Rhodococcus*. The other bacterial strains did not grow under our test conditions (PD agar, pH 7.0 and 37 °C) or might produce undetectable amounts of PHA under our conditions. Among all strains, those within the genera *Bacillus* and *Paenibacillus* showed the most intense degree of staining and may hold the best potential for production of PHA [39]. Generally, other types of feedstock such as lipids, fats, palm oil, and sludge [10] [21] [40] are used for bacterial bioplastic production. As far as we are aware, this is the first time that bacteria isolated from used engine oil have been shown to hold potential for production of PHA.

### **Degradation of alkanes of used engine oil**

In order to investigate the potential of these bacteria for bioremediation, we studied their ability to degrade the compounds found in UEO using liquid medium. The best results were achieved with a consortium of *Stenotrophomonas* and *Rhodococcus*. Following 47 days of incubation in 1% UEO, the dark colored phase disappeared when these bacteria were present in the media (Figure 2). The degradation of UEO was further investigated by FTIR. Spectra were recorded for two negative controls and for two samples obtained after bio-treatment with bacteria consortium incubated at 2 different temperatures (RT and 37 °C). The FTIR spectra of initial media (i.e. before bacterial growth) showed absorption bands (2954-2923 cm<sup>-1</sup>, 2858-2153 cm<sup>-1</sup>) that are typical for alkanes (–CH and –CH<sub>2</sub>

asymmetric stretching). Such bands are absent from the control sample (no UEO added) and in samples where the bacteria were allowed to grow at RT (Additional file: Figure S9). The apparent degradation of alkanes by the consortium was not as efficient when growth was performed at 37 °C.



A: Negative control without bacteria

B: Bio-treatment of 1% of UEO with bacteria consortium

**Figure 2:** Visual biodegradation of UEO by bacterial consortium compared to the control without bacteria (RT).

It has been documented in many studies that bacteria having potential for the degradation of petroleum hydrocarbons can be found in areas contaminated with oil. One of the two main genera identified in our study (*Rhodococcus*) was discussed in previous work of bioremediation, and was found to degrade hydrocarbons such as benzenes [36] [38]. Studies of degradation of used oil by *Stenotrophomonas* isolates [41] [42] showed that species within this genus are capable of significantly decreasing the content of polyaromatic hydrocarbons when used for the bioremediation of crude oil. The two microorganisms we used in our consortium (identified as *Stenotrophomonas* and *Rhodococcus*) have been reported to have enzymatic systems which empower them to degrade and utilize petroleum hydrocarbon as source of both carbon and energy [13] [42]. Our study fully supports earlier studies showing their superior ability for oil degradation [40][42]. However, under our conditions, we found that both bacteria were required in the same culture for bioremediation to occur (Figure 2). An analysis of these bacteria transcriptome is under way that should aid in understanding the contribution of the enzymatic machinery of each bacterium to the observed phenomenon.

### Extracellular biopolymer production and characterisation

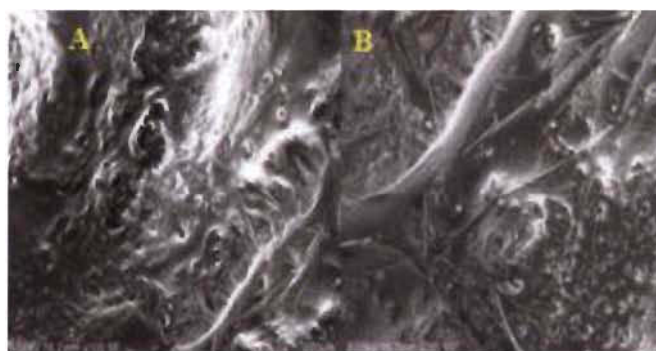


**Figure 3:** Different samples of the extracellular biopolymer produced by the bacteria consortium grown in 1% UEO.

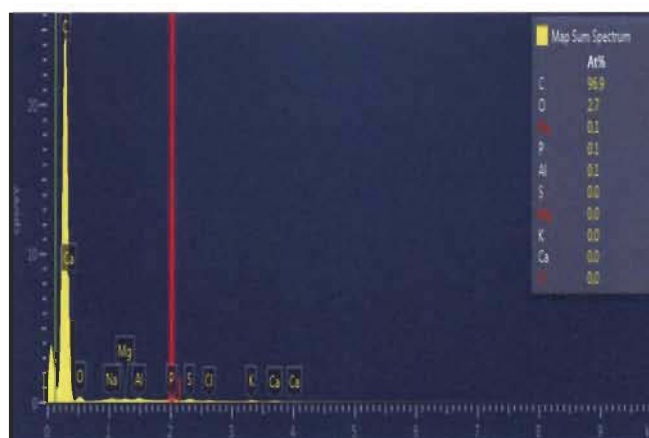
The bacteria consortium isolated from UEO (*Stenotrophomonas* and *Rhodococcus*) promoted the formation of an extracellular polymer that floated on the surface of the medium, which was not PHA (as shown in the Figure 3 above). Production of this material required specific conditions: the consortium was incubated in Mm media supplemented with 1% UEO at RT, without agitation over an incubation period ranging from 55 to 60 days. The extracellular biopolymer material was recovered and dried. FTIR analysis (Addition file: Figure S10) revealed the presence of a large peak at  $3300\text{ cm}^{-1}$ , typical for OH stretching. This may be a consequence of alcohol groups in the polymer, or from contamination of the biopolymer with water. Further drying of the material revealed the presence of several peaks were in the  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  region, which is a typical signature for alkanes. Finally, the biopolymer had vibration modes corresponding to either alkenes, aromatics and/or carbonyl groups in the  $1400\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  range. When comparing the biopolymer FTIR spectra with those of different polymers available in our database, we found that the two top matches were poly (ethylene, propylene, ethylidene: norbornene) and an unidentified thermoplastic (HR Nicolet sampling library). The former is a well-known polymer that belongs to the EPDM rubbers or elastomers. EPDM rubbers have been extensively characterised and used for the last 20 years for controlling mechanical and thermal properties of many plastic or rubber materials synthesized using petroleum-based substrates [43] [44] [45].

Control experiments were also performed with individual strains and with both strains in plastic tubes and in glass Erlenmeyer. UEO was not discolored when the individual strains were inoculated into the medium. Formation of the extracellular polymer required the presence of the consortium and occurred in glass tubes as well as in plastic tubes, indicating that its formation was not a result of plastic degradation or conversion.

Surface morphology characteristics and internal structure of the extracellular biopolymer were investigated using scanning electron microscopy (SEM) in the environmental mode. SEM suggests the existence of two different biopolymer surfaces: a rough side (A) and a smooth side (B) (Figure 4). We suggest that the latter side is the surface in contact with the medium. SEM imaging also confirmed that the extracellular polymer was not a bacterial biofilm.



**Figure 4:** SEM images showing two faces of the extracellular biopolymer produced by bacteria consortium: rough side of the polymer (A) and smooth side (B) of the biopolymer produced from UEO both detected by SEM.



**Figure 5:** EDS spectra showing the main composition of the produced polymer showing map sum spectrum (Carbon C: 96.9%).

SEM-EDS results show that the peak associated with carbon was clearly dominant, indicating that the biopolymer is carbon rich. A small amount of oxygen as well as negligible proportions of other elements (Na, P and Al) were also detected (Figure 5), although some of this may result from contamination from the culture medium.

Different studies have shown that strains of *Stenotrophomonas* and *Rhodococcus* species can produce PHA [29] [143] [149]. In contrast, our observations (visual, SEM and FTIR) suggest that this extracellular floating polymer (probably an elastomer) was produced by the bacterial consortium using UEO as substrate. Indeed, this EPDM-like biopolymer does not resemble PHA. Furthermore, we report a synergy among these strains that appears to be necessary to produce this new extracellular biopolymer.

Since this biopolymer is extracellular, it has a definitive advantage over PHA regarding production costs: PHA extraction from bacterial remains a limiting step where chemical or mechanical methods for cell lysis are required prior to PHA [29] [40] [46]. Depending on intended use, additional steps such as further purification may be required. This increases the cost of production of PHA. In contrast, the EPDM-like biopolymer that we identified in this study is extracellular and easy to recover from the broth. It can be generated using a low-cost substrate (UEO) and the cultures do not require agitation or heating. The potential industrial importance of this discovery is not limited to this biopolymer. This study could open the way to tailored biopolymer of desired composition or properties by bacteria having appropriate enzymatic machinery. Once the key enzymes have been identified, it would be possible to evolve them by directed evolution for instance, and ultimately design the structure of the final biopolymer. UEO would certainly be a substrate of choice, considering the several advantages associated with the conversion of this waste into valuable products.

## **Conclusion**

This study is the first description of bacterial strains found in a UEO recycling plant in Quebec, Canada. The identified isolates found here belong to genera also found in

previous international biodiversity studies all over the world. Many of the bacterial strains isolated were able to grow in a high concentration of used engine oil, up to 20%. Therefore, these bacteria could be useful for the abatement of ecosystems that may be contaminated with hydrocarbons. Accordingly, our FTIR results showed complete decontamination of used engine oil when a formulated consortium screened from this oil is exposed to this waste. Moreover, we report the first observation of the formation/production of an extracellular biopolymer that resembles the elastomer EPDM, an elastomer that has been successfully used in several applications for decades. We also highlighted for the first time the fact that some of the isolated bacteria from this waste (UEO) can produce PHA.

Our study opens new horizons for approaches to the problem of petroleum waste biodegradation and bio-valorization. Elucidation of enzymatic pathways in bacteria found here and their directed evolution might open the way to tailor-made biopolymer production using inexpensive and dangerous UEO ingredients as substrate.

### **Acknowledgements**

Our heartfelt thanks to Dr. Martin Kalmokoff for his generous help in editing this manuscript. MB acknowledges financial support from NSERC (CRDPJ 44514), CRIBIQ and Phoenix environnement. MG was supported by a scholarship from Proteo.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.



## References

- [1] O. US EPA, "Managing, Reusing, and Recycling Used Oil."
- [2] R. Vazquez-Duhalt, "Environmental impact of used motor oil.," *Sci. Total Environ.*, vol. 79, no. 1, pp. 1-23, Feb. 1989.
- [3] C. S. Butler and J. R. Mason, "Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases.," *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 38, pp. 47-84, 1997.
- [4] J. L. Mumford, G. E. Hatch, R. E. Hall, M. A. Jackson, R. G. Merrill, and J. Lewtas, "Toxicity of particles emitted from combustion of waste crankcase oil: in vitro and in vivo studies.," *Fundam. Appl. Toxicol.*, vol. 7, no. 1, pp. 49-57, Jul. 1986.
- [5] R. Vazquez-Duhalt and H. Greppin, "Biodegradation of used motor oil by bacteria promotes the solubilization of heavy metals," *Sci. Total Environ.*, vol. 52, no. 1-2, pp. 109-121, Jun. 1986.
- [6] M. S. Prasad and K. Kumari, "Toxicity of Crude Oil to the Survival of the Fresh Water Fish *Puntius sophore* (HAM.)," *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, vol. 15, no. 1, pp. 29-36, 1987.
- [7] "Parce que chaque goutte compte!"
- [8] C. M. Castro-Barros, L. T. Ho, M. K. H. Winkler, and E. I. P. Volcke, "Integration of methane removal in aerobic anammox-based granular sludge reactors," *Environ. Technol.*, vol. 39, no. 13, pp. 1615-1625, Jul. 2018.
- [9] M. Ghribi, F. Meddeb-Mouelhi, and M. Beauregard, "Microbial diversity in various types of paper mill sludge: identification of enzyme activities with potential industrial applications," *Springerplus*, vol. 5, no. 1, 2016.
- [10] N. Altaee, A. Fahdil, E. Yousif, and K. Sudesh, "Recovery and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate from *Rhodococcus equi* cells grown on crude palm kernel oil," *J. Taibah Univ. Sci.*, vol. 10, no. 4, pp. 543-550, Jul. 2016.
- [11] K. Rose and A. Steinbüchel, "Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 6, pp. 2803-12, Jun. 2005.

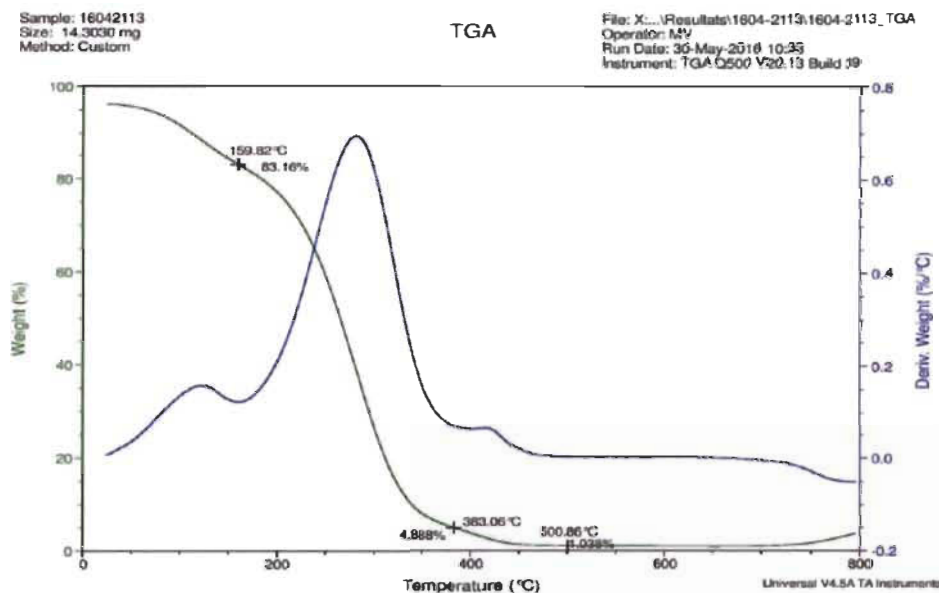
- [12] K. Temitope Eniola and E. Kit, "Biodegradation of Used Engine Oil By Bacteria Isolated From Soil Contaminated With Used Engine Oil in Ogbomoso, Nigeria Biodegradation work View project Biodegradation studies View project Biodegradation of Used Engine Oil By Bacteria Isolated From Soil Contaminated With Used Engine Oil in Ogbomoso, Nigeria," *IOSR J. Environ. Sci.*, vol. 8, no. 5, pp. 66-70, 2014.
- [13] H. Al Nasrawi, "Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico," *J. Bioremediation Biodegrad.*, vol. 03, no. 04, 2012.
- [14] S. K. Chaerun, K. Tazaki, R. Asada, and K. Kogure, "Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria," *Environ. Int.*, vol. 30, no. 7, pp. 911-922, Sep. 2004.
- [15] H. Al Nasrawi, "Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico," *J. Bioremediation Biodegrad.*, vol. 03, no. 04, pp. 1-6, Apr. 2012.
- [16] J.-L. Li and B.-H. Chen, "Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 1, pp. 76-94, Feb. 2009.
- [17] M. Ebrahimi, M. R. Sarikhani, and R. Fallah, "Assessment of biodegradation efficiency of some isolated bacteria from oil- contaminated sites in solid and liquid media containing oil-compounds," *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 138-147, 2012.
- [18] R. A Beg, M. R. I. Sarker, and M. Pervez, "Production of diesel fuel from used engine oil," *Int. J. Mech. Mech. Eng.*, vol. 10, 2010.
- [19] "How a Quebec program is recycling used oil and protecting the environment - Canadian Fuels Association." [Online]. Available: <http://www.canadianfuels.ca/Blog/February-2017/How-a-Quebec-program-is-recycling-used-oil-and-protecting-the-environment/>. [Accessed: 11-Jul-2018].
- [20] K. Das and A. K. Mukherjee, "Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 7, pp. 1339-1345, 2007.
- [21] K. Madhavan Nampoothiri, N. R. Nair, and R. P. John, "An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 22, pp. 8493-8501, 2010.

- [22] E. Montenegro, G. Delabary, M. Silva, F. Andreote, and A. Lima, "Molecular Diagnostic for Prospecting Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacteria," *Bioengineering*, vol. 4, no. 2, p. 52, 2017.
- [23] F. Meddeb-Mouelhi, J. K. Moisan, and M. Beauregard, "A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 66, pp. 16-19, 2014.
- [24] G. Kumar *et al.*, "Bioremediation of petrol engine oil polluted soil using microbial consortium and wheat crop," *J. Pure Appl. Microbiol.*, vol. 11, no. 3, 2017.
- [25] R. Abu-Ellella, M. E. Ossman, R. Farouq, and M. Abd-Elfatah, "Used Motor Oil Treatment: Turning Waste Oil into Valuable Products," *Int. J. Chem. Biochem. Sci.*, vol. 7, no. August, pp. 57-67, 2015.
- [26] A. Wentzel, T. E. Ellingsen, H.-K. Kotlar, S. B. Zotchev, and M. Throne-Holst, "Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 76, no. 6, pp. 1209-1221, Sep. 2007.
- [27] Y. S. Goh and I. K. P. Tan, "Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island," *Microbiol. Res.*, vol. 167, no. 4, pp. 211-219, Apr. 2012.
- [28] T. Kato, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya, "Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 91, no. 1, pp. 64-70, 2001.
- [29] N. Altaee, A. Fahdil, E. Yousif, and K. Sudesh, "Recovery and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate from *Rhodococcus equi* cells grown on crude palm kernel oil," *J. Taibah Univ. Sci.*, vol. 10, no. 4, pp. 543-550, 2016.
- [30] Sukumar and Nirmala P, "Screening of diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soil," *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, vol. 3, no. 8, pp. 18-22, 2016.
- [31] J.-L. Li and B.-H. Chen, "Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 1, pp. 76-94, Feb. 2009.
- [32] R. Gurav, H. Lyu, J. Ma, J. Tang, Q. Liu, and H. Zhang, "Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 12, pp. 11392-11403, 2017.

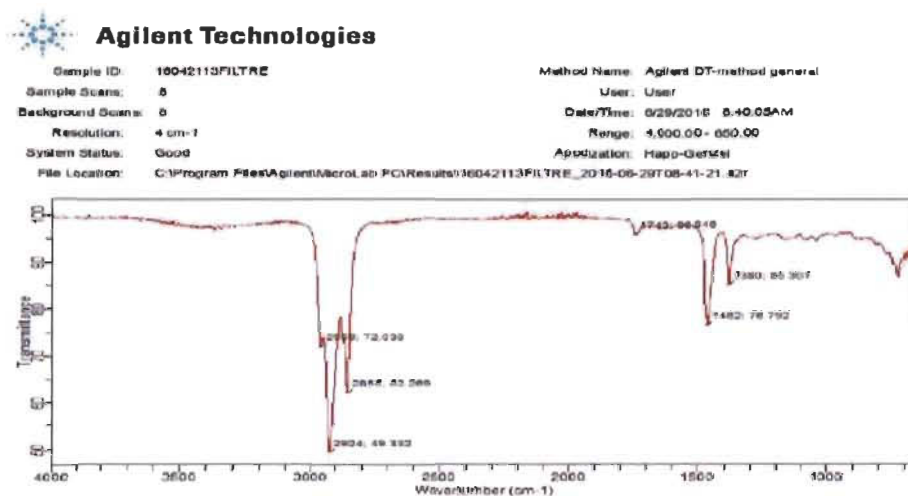
- [33] P. Nirmala, "International Journal of Advanced Research in Biological Sciences Screening of diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soil," vol. 3, no. 8, pp. 18-22, 2016.
- [34] K. Santhini, J. Myla, S. Sajani, and G. Usharani, "Screening of *Micrococcus* Sp from Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation," *Bot. Res. Int.*, vol. 2, no. 4, pp. 248-252, 2009.
- [35] T. Kato, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya, "Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 91, no. 1, pp. 64-70, 2001.
- [36] C. A. Nicholson and B. Z. Fathepure, "Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 1222-5, Feb. 2004.
- [37] I. M. Head, D. M. Jones, and S. R. Larter, "Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil," *Nature*, vol. 426, no. 6964, pp. 344-352, 2003.
- [38] O. P. Abioye, P. Agamuthu, and A. R. Abdul Aziz, "Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments," *Biotechnol. Res. Int.*, vol. 2012, pp. 1-8, 2012.
- [39] K. B. Anish, S. Gulab, K. A. Neeraj, G. Varsha, and Y. Anita, "Isolation and screening of Polyhydroxybutyrates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes," *Int J Biomat.*, vol. 1155, 2013.
- [40] B. Singh Saharan, A. Grewal, and P. Kumar, "Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments," *Chinese J. Biol.*, vol. 2014, pp. 1-18, 2014.
- [41] P. K. S. Virupakshappa, M. B. Krishnaswamy, G. Mishra, and M. A. Mehkri, "Optimization of Crude Oil and PAHs Degradation by *Stenotrophomonas rhizophila* KX082814 Strain through Response Surface Methodology Using Box-Behnken Design," *Biotechnol. Res. Int.*, vol. 2016, pp. 1-13, 2016.
- [42] A. L. Juhasz, G. A. Stanley, and M. L. Britz, "Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 30, no. 5, pp. 396-401, May 2000.
- [43] A. U. Paeglis, "A Simple Model for Predicting Heat Aging of EPDM Rubber," *Rubber Chem. Technol.*, vol. 77, no. 2, pp. 242-256, May 2004.

- [44] S. Shaw and R. P. Singh, "Studies on impact modification of polystyrene (PS) by ethylene-propylene-diene (EPDM) rubber and its graft copolymers. II. PS/EPDM-g-(styrene-co-methylmethacrylate) blends," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 40, no. 56, pp. 693-699, Sep. 1990.
- [45] D. A. Jackson, J. T. Koberstein, and R. A. Weiss, "Small-angle X-ray scattering studies of zinc stearate-filled sulfonated poly (ethylene-co-propylene-co-ethylidene norbornene) ionomers," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 37, no. 21, pp. 3141-3150, Nov. 1999.
- [46] P. Singh and N. Parmar, "Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria," *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 24, pp. 4907-4919, 2011.
- [47] P. Singh and N. Parmar, "Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate ( PHB ) -producing bacteria," *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 24, pp. 4907-4919, 2011.

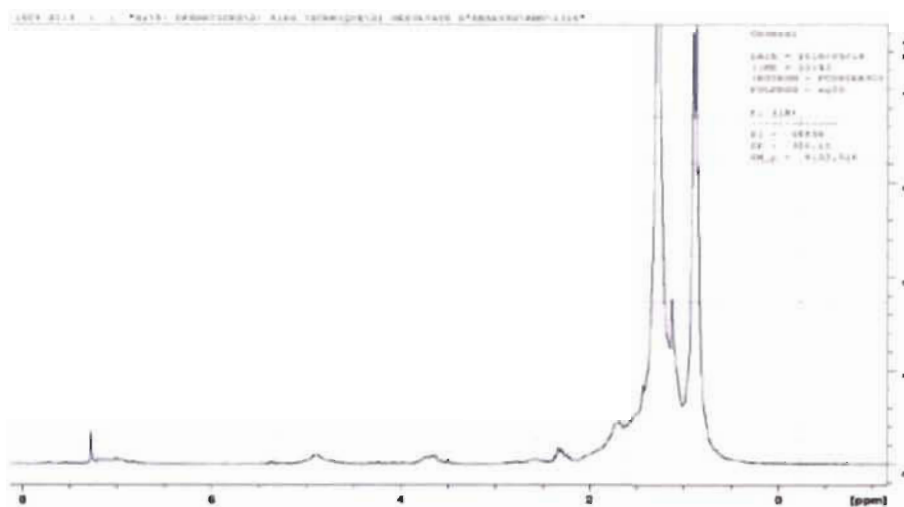
## Supplementary materials



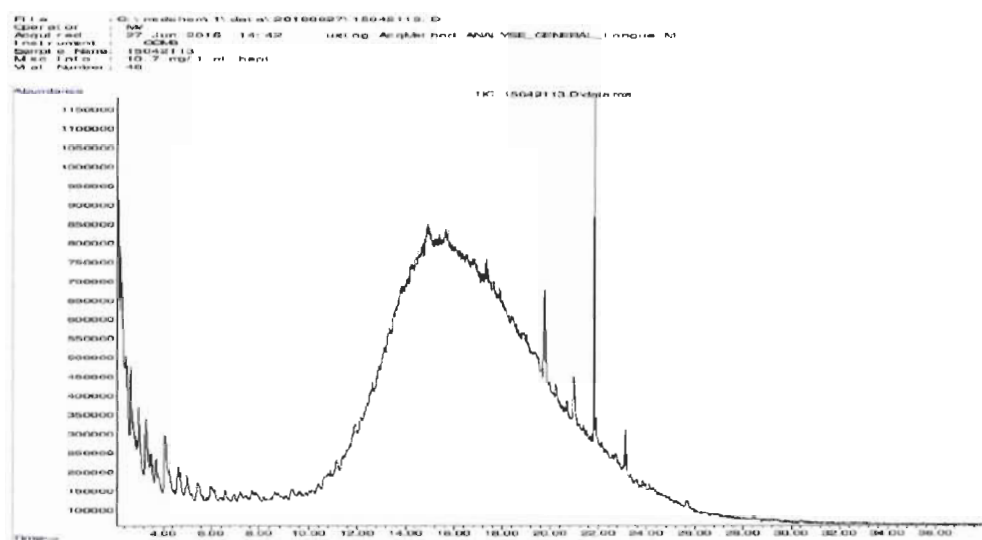
**Figure S1** Thermo Gravimetric Analysis TGA curve of Used Engine Oil Analysis from 0 °C to 800 °C.



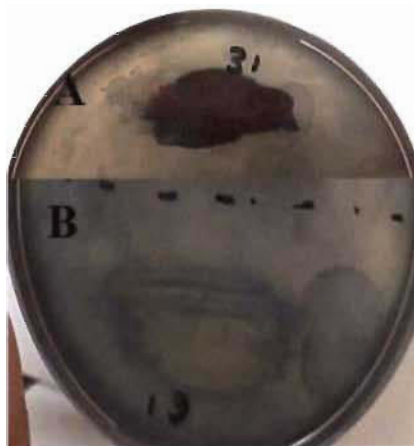
**Figure S2** Fourier -Transformation Infra-Red (FTIR) spectra pattern of UEO.



**Figure S3** NMR spectra of Used Engine Oil (0-8 ppm).

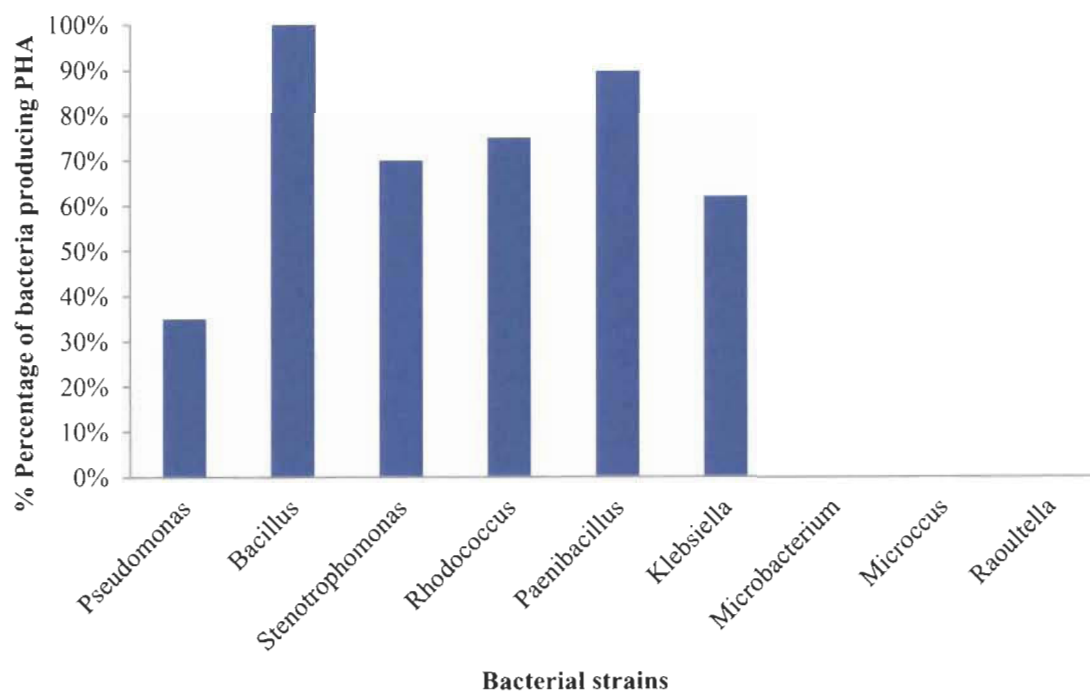


**Figure S4** Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (GC-FID) spectra of UEO.



A: Positive bacteria colony growth on agar PDA media after staining with SBB  
 B: Negative bacteria colony on PDA media after staining with SBB

**Figure S5** PHA UEO bacteria detected by Sudan Black B staining (PDA media, pH 7, 37 °C).



**Figure S6** Percentage of total PHA producing bacterial genera screened from UEO.

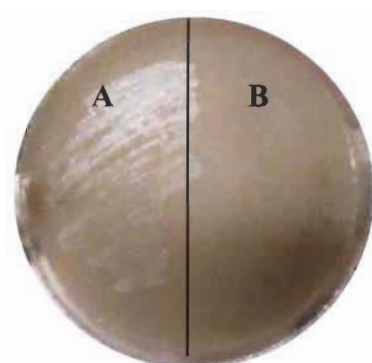


**Tableau S1** Morphological, biochemical characterization and pH growth of bacteria screened from used engine oil

# Strains	Gram <sup>a</sup>	Spores <sup>b</sup>	Oxy <sup>c</sup>	Cat <sup>d</sup>	Forme	pH range (6,7,12)
1	+	+	+	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
2	-	+	+	-	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
3	-	+	+	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
4	+	+	+	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
5	-	-	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7</sup>
6	-	+	+	+	<i>Coccobacilles</i>	+ <sup>7</sup>
7	+	+	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7</sup>
8	+	+	-	+	<i>Coccus</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
9	+	+	-	+	<i>Coccus</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
10	-	+	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>7</sup>
11	-	-	-	-	<i>Coccus</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
12	-	+	-	+	<i>Coccus</i>	+ <sup>7</sup>
13	+	+	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>7,12</sup>
14	-	+/-	-	-	<i>Bacille</i>	+ <sup>7</sup>
15	-	+	+	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>7,12</sup>
16	+	+	-	-	<i>Coccobacilles</i>	+ <sup>7</sup>
17	+	-	+	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>7,12</sup>
18	+	-	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>7</sup>
19	+	-	+	+	<i>Coccus</i>	+ <sup>7</sup>
20	-	+/-	+	-	<i>Bacille</i>	+ <sup>7,12</sup>
21	-	+	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>7</sup>
22	-	+	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>7</sup>
23	-	-	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
24	-	+	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>7</sup>
25	+	-	-	+	<i>Coccus</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
26	-	+	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
27	-	+	+	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
28	-	+	+	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
29	-	+/-	+	+	<i>Small Bacilles</i>	+ <sup>7</sup>
30	+	+	-	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
31	-	+/-	-	+	<i>Coccobacilles</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
32	+	-	+	+	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
33	+	+	+	-	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>
34	-	+	+	-	<i>Bacille</i>	+ <sup>6,7,12</sup>

# Strains	Gram <sup>a</sup>	Spores <sup>b</sup>	Oxy <sup>c</sup>	Cat <sup>d</sup>	Forme	pH range (6,7,12)
35	-	-	-	+	<i>Coccus</i>	+6,7,12
36	+	+	+	+	<i>Bacille</i>	+6,7,12
37	-	+	-	-	<i>Coccus</i>	+7,12
38	+	-	+	+	<i>Bacille</i>	+7
39	-	+	+	+	<i>Coccus</i>	+7
40	-	+	+	+	<i>Coccus</i>	+7
41	+	+	+	+	<i>Bacille</i>	+6,7,12
42	+	-	+	+	<i>Coccus</i>	+6,7,12
43	-	+-	+	+	<i>Bacille</i>	+7
44	+	+	+	+	<i>Bacille</i>	+6,7,12
45	+	+	-	-	<i>Bacille</i>	+6,7,12
46	+	-	+	+	<i>Bacille</i>	+7,12
47	+	-	-	+	<i>Coccobacilles</i>	+7,12
48	-	+	-	+	<i>Bacille</i>	+6,7,12
49	+	-	-	+	<i>Coccobacilles</i>	+7
50	+	-	+	+	<i>Coccus</i>	+6,7,12
51	-	-	+	+	<i>Bacille</i>	+7
52	+	-	+	+	<i>Bacille</i>	+7,12
53	+	-	-	+	<i>Coccobacilles</i>	+7,12
54	+	-	+	+	<i>Coccus</i>	+6,7,12

a: Gram positive + and Gram negative -; b: + sporulate, -: does not sporulate; +-: small spores where observed; c: Oxidase: + oxidase activity, -: no oxidase activity; d: Catalase, +: catalase activity and - : no catalase activity.



A: Growth on Mm media supplemented with used engine oil 10%

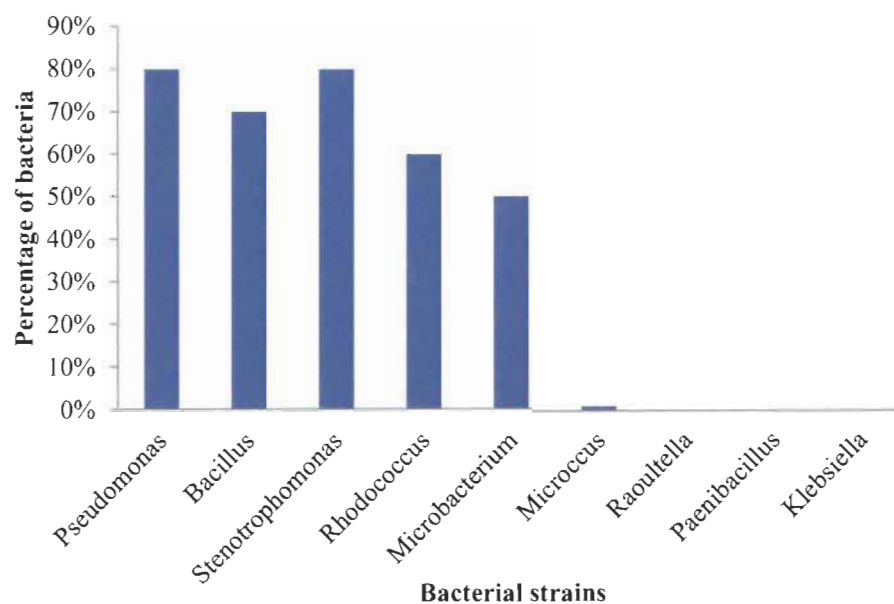
B: No growth on Mm media supplemented used engine oil 10%

C



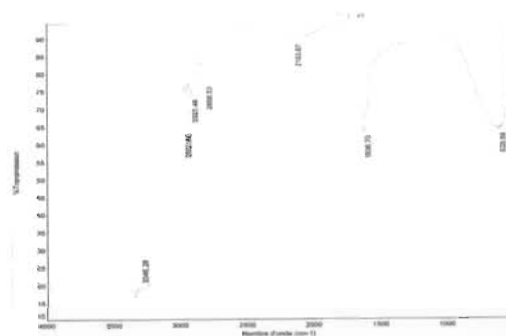
C: Different morphologies of bacteria grown on Mm media supplemented with 20% used

**Figure S7** Bacteria resisting to high concentration of UEO (10%, 20%).

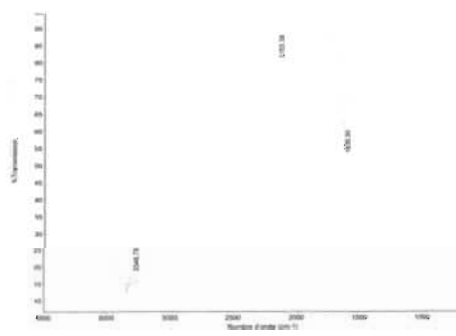


This graph represents the maximum percentage of bacteria number able to grow on 20% UEO.

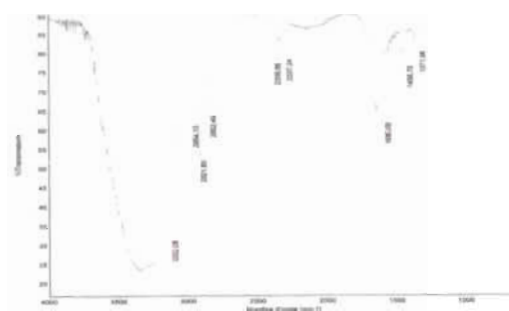
**Figure S8** Resistance of bacteria isolated from used engine oil and growth on Mm supplemented with 20% used engine oil for 7 days growth at pH7.



A. FTIR of bacterial bio-treatment of Mm media supplemented with 1% UEO at 37°C pH 7 under agitation 180 rpm, agitation 180 rpm

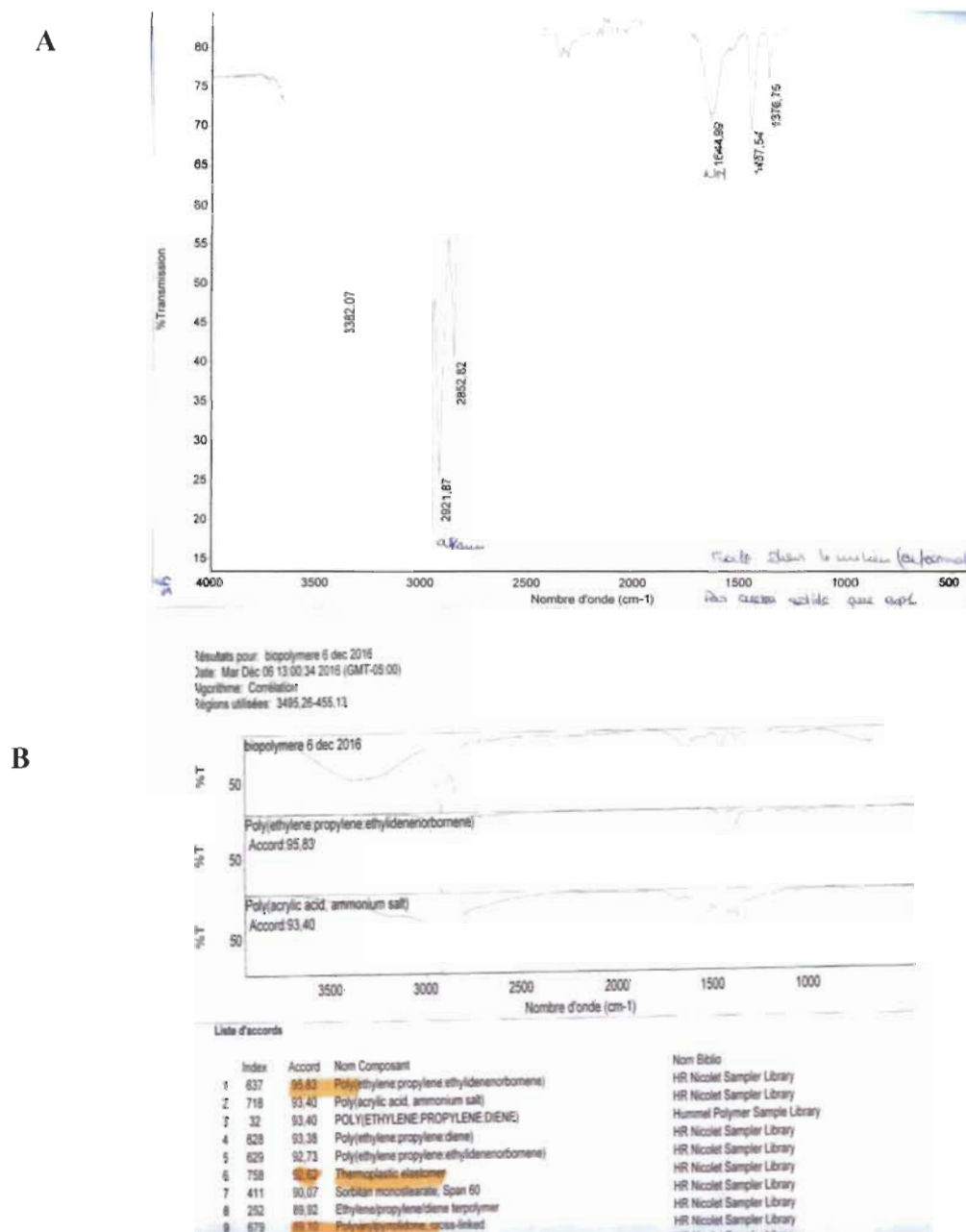


B. FTIR of bacterial bio-treatment of Mm media supplemented with 1% UEO at RT, pH 7 under agitation 180 rpm



C. FTIR of Mm media supplemented with 1% UEO, pH 7 under agitation 180 rpm (negative control)

**Figure S9** FTIR spectra of Mm media with 1% with and without bacteria at different conditions (pH7, RT, 37 °C and 180 rpm).



A: FTIR spectra of the biopolymer

B: Results of matching of the FTIR spectra against the libraries

**Figure S10** FTIR spectra of extracellular biopolymer formed by bacteria consortium (RT, no agitation, pH7).

Le chapitre IV consiste en une discussion qui porte sur les deux chapitres II et III ainsi qu'une étude plus poussée pour pouvoir comprendre les mécanismes de production du biopolymère EPDM par le nouveau consortium bactérien.

Le tout se termine avec les perspectives des différents projets abordés dans les chapitres II, III et IV ainsi qu'une conclusion générale dans le chapitre V.

## **CHAPITRE IV**

### **DISCUSSION**

La nature ne se dompte pas si facilement, seule une infime proportion des micro-organismes est cultivable dans les milieux de culture conventionnels utilisés par l'homme. Les chercheurs estiment en effet que plus de 99 % des bactéries qui seraient viables en laboratoire y sont non cultivables. Ils ont même surnommé la biodiversité inaccessible « la matière noire microbienne », car elle serait aussi difficile à apprivoiser que la matière noire de l'espace. Dans cette thèse, nous avons essayé de chercher les bactéries viables et cultivables à partir des deux types d'échantillons environnementaux à savoir les huiles usées de moteur (les huiles de vidange) de chez Phoenix environnement et les différents types de boues papetières de l'industrie Kruger-Wayagamak ici à Trois-Rivières. On abordera lors de ce chapitre trois volets essentiels :

- 1) La biodiversité microbienne des deux milieux industriels étudiés
- 2) La biodiversité enzymatique reliée à cette biodiversité microbienne
- 3) Le potentiel des applications industrielles qui leur sont reliées

#### **4.1 Composition des deux milieux industriels**

Avant de parler de biodiversité bactérienne et enzymatique des deux milieux sélectionnés pour cette étude, il est pertinent de mettre l'accent sur les différences et les similarités entre les deux échantillons. Que ce soit au niveau de leurs matières organiques principales qui les composent, ou au niveau des paramètres physicochimiques caractéristiques de ces deux échantillons (à savoir pH, température, etc.). Ces points ont été relevés dans le Tableau 4.1.



**Tableau 4.1**

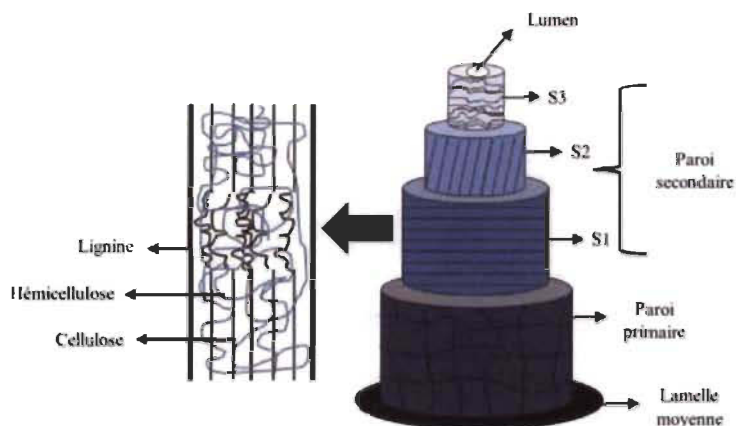
Différence et similarité entre les deux échantillons industriels étudiés au niveau de leurs compositions et de leurs paramètres physicochimiques

	<b>Boues papetières</b>	<b>HUM</b>
	Substrat principal	
<b>Alcanes</b>		✓
<b>Cellulose</b>	✓	
<b>Xylane</b>	✓	
<b>Lignine</b>	✓	
<b>Métaux</b>		✓
<b>Esters lipidiques</b>	✓	
<b>Température (C)</b>	25-30	20-25
<b>pH</b>	3-8	6.8-7.2

D'après le tableau 4.1, il est à noter que la différence au niveau de certains paramètres des milieux est très claire. Par exemple, la matière organique principale dans les huiles usées de moteur est l'alcane. Les alcanes sont des hydrocarbures saturés constitués uniquement de carbones (C) et d'hydrogène (H). On retrouve dans les huiles usées de moteur différents types d'alcanes : *i)* non volatiles constitués de 1 à 8 atomes de carbones, *ii)* des alcanes supérieurs notamment appelés des alcanes lourds (plus que 9 atomes de carbones) *iii)* des molécules d'alcane qui n'exercent entre elles que des liaisons intermoléculaires de type interactions de Van der Waals. Ces liaisons sont relativement faibles et rendent ces alcanes volatiles *iiii)* et enfin, on retrouve les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (les composants d'huiles moteur usées les plus polluants), qui sont généralement adsorbés aux matières particulaires et vont se déposer sur le sol et dans l'eau.

Du côté des boues papetières, on trouve que c'est la cellulose, la lignine, le xylane et les extractibles lipidiques qui composent principalement ce type d'échantillon industriel. La lignine confère de la rigidité au bois et se retrouve autour et parmi les fibres (elles-mêmes composées de la cellulose, hémicellulose et xylane). Ces principaux

composants organiques des boues papetières proviennent des fibres de bois en traitement dans l'industrie (Figure 4.1).



**Figure 4.1** Composition de la fibre de bois montrant la disposition relative des polymères. La lignine recouvre la fibre, et est donc montrée aux extrêmes (haut et bas) de la figure. La cellulose est en plein centre du dessin, donc au milieu de la fibre [153].

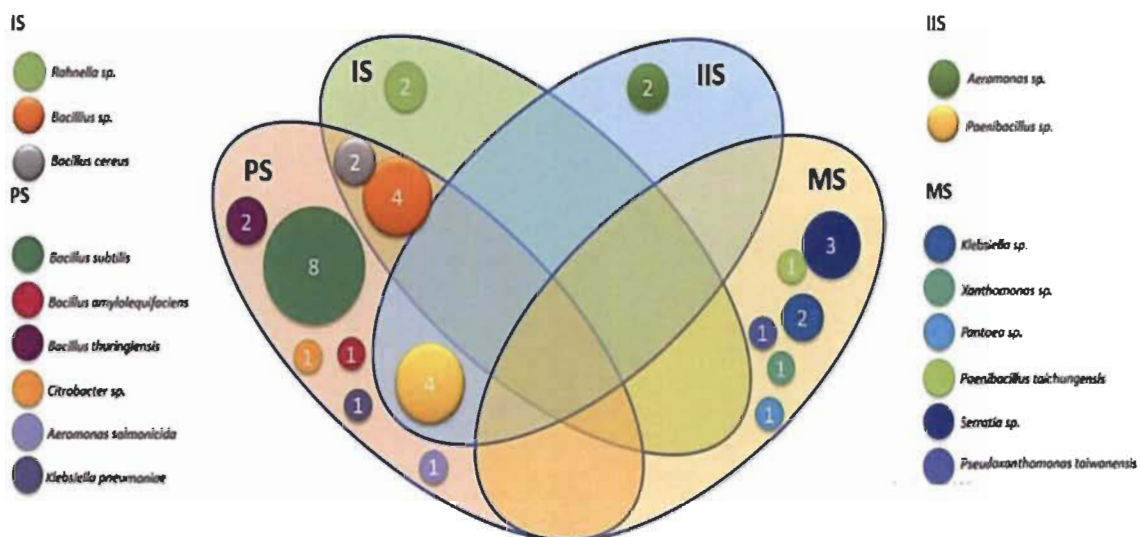
On peut ainsi conclure qu'on a deux milieux très différents au niveau de leur composition organique. En termes de composants inorganiques, on remarque que les huiles usées de moteur sont très riches en métaux. Ces derniers sont issus essentiellement de l'usure du moteur (baryum par exemple). On n'a pas retrouvé des métaux au niveau des boues papetières, probablement à cause des méthodes de détection utilisées, alors que ce type de contaminants peut être généré par la corrosion ou l'usure au niveau des machines dans l'usine papetière. Donc leur présence peut avoir lieu, mais en concentration infime selon les analyses [154].

Au niveau des facteurs physicochimiques qui peuvent influencer la composition des milieux, on remarque que la température des deux échantillons est semblable (température de la pièce généralement, sauf pour quelques échantillons de boues qu'on retrouve proches des machines dégageant de la chaleur) ainsi comme mentionné dans le tableau 4.1, la température peut aller jusqu'à 30 °C pour certains prélèvements effectués au niveau de l'industrie papetière qui sont proches des machines dégageant de la chaleur. Le pH mesuré des prélèvements des boues papetières varie entre 3 et 8 dépendamment

des types de boues primaires, secondaires, boues de machine ou boues de presse. Quant aux huiles usées de moteur (c.-à-d. leur fraction aqueuse), des variations de pH très faibles sont détectées entre les différents échantillons étudiés allant de 6,8 à 7,2.

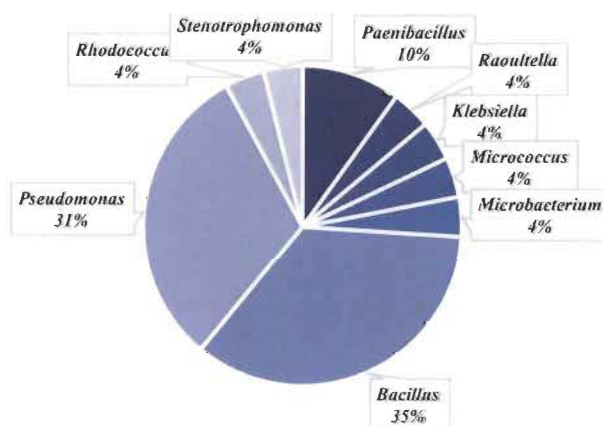
## 4.2 Les boues papetières

Les bactéries représentent une source abondante de différentes enzymes industrielles et offrent des avantages par rapport à d'autres microorganismes en raison de leur croissance rapide, de leurs coûts de production modérés, de leur complexité et de leur richesse en enzymes et en biodiversité. Ici, nous avons examiné la communauté bactérienne facilement cultivable contenue dans les boues d'usine de papier Kraft et nous avons étudié par la suite le potentiel de ces isolats pour des applications enzymatiques industrielles. Par exemple, les espèces *Serratia* et *Raoultella* ont été trouvées uniquement dans les boues de machine (MS), tandis que les espèces de *Rahnella* ne se localisaient principalement que dans les boues primaires IS. Les boues de presse (PS) abritaient la communauté bactérienne la plus diverse, un grand nombre de ces isolats tolérant des conditions extrêmes de température et de pH (pH 12). De plus, les souches de PS ont également exprimé le plus grand nombre d'activités enzymatiques hydrolytiques et ligninolytiques. Ceci est une conséquence possible de la composition dense et très complexe des boues de presse PS. Certains genres se sont révélés spécifiquement associés au type de boue échantillonnée. Par exemple, *Aeromonas sp.* est uniquement retrouvé chez les IIS et *Rhanella* a été identifié uniquement chez les IS. Alors que d'autres bactéries sont communes dans deux boues : par exemple *Bacillus cereus* et *Bacillus sp.* qu'on retrouve chez IS et PS. *Paenibacillus sp.* est mieux représenté dans IIS et PS (Figure 4.2).



### 4.3 La biodiversité des huiles usées de moteur

Cette étude est la première description de souches bactériennes trouvées dans une usine de recyclage d'HUM au Québec, Canada. Les isolats identifiés trouvés ici sont conformes aux précédentes études internationales, sur la biodiversité, menées dans le monde entier pour ce genre d'environnement (incluant des pays chauds) [155] [156].



**Figure 4.3** Schématisation de la biodiversité des bactéries isolées des huiles usées de moteur.

Différentes espèces ont été isolées à partir des huiles usées de moteur, représentées majoritairement par les *Bacillus* et *Paenibacillus*. Ces bactéries sont les habitants dominants et ubiquitaires de presque tous les milieux et les échantillons naturels.

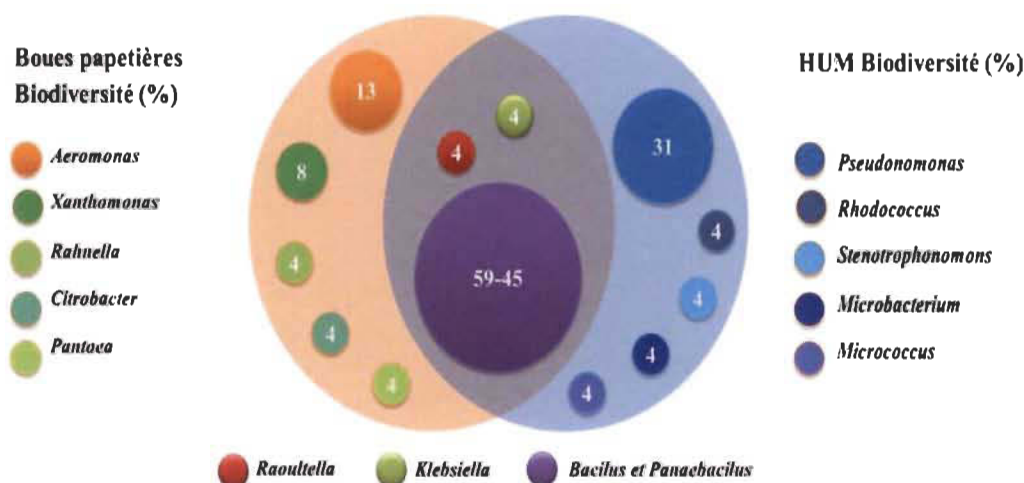
Ce résultat obtenu (Figure 4.3) est compatible avec des études antérieures réalisées sur la biodiversité bactérienne des huiles usées de moteur. Ces études démontrent que les espèces de *Pseudomonas* sont capables de dégrader des chaînes d'alcanes linéaires de moyenne longueur allant de C20 à C34, tandis que les espèces de *Bacillus* se sont avérées capables de dégrader les alcanes linéaires allant de C9 à C30 et ces deux espèces sont présentes dans la majorité des huiles usées de moteur et des sols contaminés par ce déchet. La présence d'*Arthobacter sp.* dans des sites contaminés par le diesel avait déjà été rapportée mais cette espèce bactérienne n'a pas été retrouvée ici. En ce qui concerne *Microbacterium*, il a également été détecté dans un sol contenant du fluoranthène et récemment isolé à partir de pétrole brut dans un champ pétrolier de Dagang en Chine [157]. D'autres espèces de bactéries telles que *Micrococcus* ont également été trouvées sur des sites contaminés par de l'huile de moteur usée en Inde. En général, les souches trouvées ici ont également été trouvées dans des HUM d'Afrique du Sud, d'Arabie saoudite, d'Inde, d'Égypte et de Chine en dépit de la grande différence de conditions climatiques qui s'appliquent au Canada [138] [158] [155] [156]. Cette observation suggère que certaines espèces bactériennes peuplant les HUM ne sont pas déterminées par la température. D'ailleurs ces souches bactériennes ont été testées pour leur capacité de croissance et de développement à différentes températures et elles ont démontré une flexibilité d'adaptation et de croissance sur une plage de température s'étalant entre 4 et 50 °C, dont les plus résistants aux températures extrêmes sont les *Bacillus*.

D'autre part, les souches bactériennes sélectionnées dans cette recherche ont également été testées pour différentes concentrations des huiles usées de moteur. Certaines souches bactériennes ont montré une résistance à la concentration élevée de 20 % en huile moteur usée qui a été testée pour la première fois dans cette étude. Généralement, la résistance des bactéries est testée pour des concentrations ne dépassant pas 10 % de HUM dans les études semblables précédemment rapportées. Avec une telle

résistance, ces bactéries obtenues au cours de la présente étude pourraient jouer un rôle important dans la réduction des écosystèmes contaminés par des hydrocarbures par bioremédiation pour traiter un sol contaminé par des huiles de moteur.

#### 4.4 La comparaison de la biodiversité

L'une des limites possibles de ce travail réside dans le moyen de criblage et de détection des microorganismes. En effet, l'approche utilisée est susceptible d'avoir affecté la biodiversité finale des souches présentes dans l'huile de moteur usagée étudiée. Plus précisément, il reste la possibilité que d'autres souches bactériennes anaérobies et incultivables soient associées à ces échantillons. De nombreuses autres souches pourraient être détectées dans d'autres conditions de culture et avec des techniques d'identification microbienne plus avancées.



**Figure 4.4** Comparaison de la biodiversité entre les deux échantillons utilisés (à savoir les huiles usées de moteur de Phoenix environnement et les boues papetières de Kruger).

Les résultats de la Figure 4.4 nous amènent à déduire que certaines souches bactériennes sont uniquement spécifiques aux milieux dans lequel elles se retrouvent, dépendamment du substrat qui leur est disponible pour assurer leur croissance et leur survie dans ce type de milieu. On peut citer ici à titre d'exemple les *Stenotrophomonas* et

les *Xanthomonas*. Chacun de ces genres préfère un milieu différent que ce soit riche en alcanes comme source de carbone pour *Stenotrophomonas* ou riche en extractibles lipidiques pour *Xanthomonas*. On peut ainsi évoquer la théorie de la relation **mono paramétrique** discutée auparavant. Ces bactéries sont dépendantes principalement de la présence de leur type de substrat essentiel dans leur milieu de croissance initial. Même si elles sont capables de pousser, une fois isolées, sur des milieux de culture conventionnels au laboratoire, leur genre est mieux représenté dans leur milieu naturel.

D'autres souches que nous avons identifiées dans cette étude ne démontrent pas de préférences au milieu dans lequel elles existent ou ne manifestent pas d'exigences particulières par rapport à un élément (ou un paramètre) précis de ce milieu. Au contraire, elles exhibent une tolérance totale par rapport aux différents paramètres du milieu original où elles se retrouvent. On qualifie ceci par une relation **multi-paramétrique** avec les différents éléments du milieu. Ces bactéries sont généralement connues pour être ubiquitaires et dominantes en nombre et en espèces dans leurs environnements. On peut citer principalement dans cette étude, les bactéries de genre *Bacillus* et *Paenibacillus*.

*B. subtilis* est la première bactérie gram positive dont le génome a été complètement séquencé et depuis lors, les génomes de plusieurs espèces de *Bacillus* ont suivi. Il est intéressant de savoir qu'au niveau de la taille, le génome de *Bacillus* est semblable à celui d'*E. coli* [159]. Cela suggère que ce n'est pas la taille du génome qui détermine son ubiquité et son adaptation à différents milieux, mais c'est plus la qualité des gènes exprimés et la batterie enzymatique qu'il renferme. D'après Sharma et Satyanarayana [160], *B. subtilis* possède moins de gènes impliqués dans la réplication, la recombinaison et la réparation qu'*E. coli* montrant ainsi une relation avec de rares éléments répétitifs. D'autre part, le nombre moyen de gènes reliés aux glucides, le transport et le métabolisme sont élevés, car il s'agit d'une bactérie du sol qui est en contact étroit avec des plantes et leurs produits.

Ainsi, l'établissement d'une relation entre le métabolisme intermédiaire (à savoir les enzymes et les produits générés par ces enzymes) et la structure du génome, sa fonction

et son évolution, est le facteur clé pour comprendre cette dominance bactérienne dans un milieu par rapport à un autre. L'adaptation microbiologique discutée ci-haut implique une adaptation du complément enzymatique des bactéries des HUM et celles isolées des boues papetières.

## **4.5 Biodiversité des enzymes bactériennes**

### **4.5.1 Biodiversité des enzymes de l'industrie papetière**

Un des résultats intéressants ressortis lors de l'étude réalisée à l'industrie papetière est de pouvoir localiser la production de certaines catégories d'enzymes par rapport aux types de boues où on a échantillonné les bactéries productrices d'enzyme. Par exemple, la communauté bactérienne retrouvée dans les boues de machine (MS) était également très diverse. On a retrouvé dans ces boues presque toute la panoplie des enzymes détectées dans la papetière. Cependant, ces isolats sont dépourvus d'activité xylanase, ce qui peut refléter la rareté des fibres de xylane dans ce type de boues. Les bactéries isolées à partir de PS ont démontré une activité soit de la cellulase, soit de la xylanase, un fait non surprenant vu que ce milieu est un mélange des boues primaires et secondaires et il est très concentré en fibres de bois faites principalement de la cellulose et du xylane.

Afin de caractériser davantage la biodiversité, nous avons examiné le potentiel ligninolytique de ces souches. Les activités enzymatiques ligninolytiques étudiées renferment : la laccase (Lac), de la lignine peroxydase (LiP) et de la manganèse peroxydase (MnP) [161] [162] [163]. Vingt-deux souches isolées à partir de la papetière ont exprimé au moins une activité enzymatique ligninolytique extracellulaire. Trois souches (*Paenibacillus sp.*, *Klebsiella pneumonia* et *Raoultella terrigena*) ont produit les trois activités extracellulaires à la fois. On remarque également leur potentiel dans différentes applications utilisant le complexe des enzymes ligninolytiques, le restant des souches n'en a présenté aucune.



Une gamme variée d'espèces de *Bacillus* englobant une grande variété d'activités enzymatiques ont été associées aux quatre échantillons de boues utilisés dans cette étude soulignant ainsi l'importance des enzymes produites par ce genre bactérien. Donc, non seulement les *Bacillus* sont des microorganismes ubiquitaires, mais ils possèdent également une machinerie enzymatique très adaptée et quasi-complète permettant leur survie et leur adaptation aux différents types de boues.

#### **4.5.2 Le cas de *Bacillus***

Considérant leur présence dans les différents environnements étudiés ici (boues papetières et huiles usées de moteur), les *Bacillus* sont devenus un genre bactérien clé dans cette étude pour l'analyse de leur profil enzymatique et leur mécanisme.

Ces bactéries démontrent également une résistance aux différents composants des milieux et sont dotées d'une machinerie enzymatique adéquate et variable selon leur milieu d'origine. Les propriétés relatives aux *Bacillus* rendent les bactéries reliées à ce genre des habitants communs et présents dans presque tous les environnements. Selon Priest [164], la grande variété d'exoenzymes synthétisées par les *Bacillus* est le facteur clé de leur omniprésence dans des milieux extrêmement variés et lointains en termes de composition. Une autre théorie importante, discutée dans une autre étude de Priest [165] concernant les exoenzymes, implique que la synthèse maximale des enzymes extracellulaires se produit normalement avant la sporulation des *Bacillus*, dans les phases exponentielles tardives et au début des phases stationnaires de croissance. Dans d'autres études antérieures, cette théorie a suggéré la possibilité d'une causalité entre synthèse d'exoenzyme et sporulation. Cependant, la transition de la croissance de la phase exponentielle à la phase stationnaire est souvent accompagnée par un épuisement de la source de carbone et des changements dans les conditions de cultures qui vont activer de nombreux gènes réprimés par certains catabolites [165]. Par conséquent, il est difficile de décider si l'apparition d'une enzyme est due à la modification environnementale ou l'expression d'un gène spécifique de sporulation. Dans de nombreux cas, l'utilisation des mutants a clarifié cette situation. Clairement, si un mutant est déficient en une enzyme

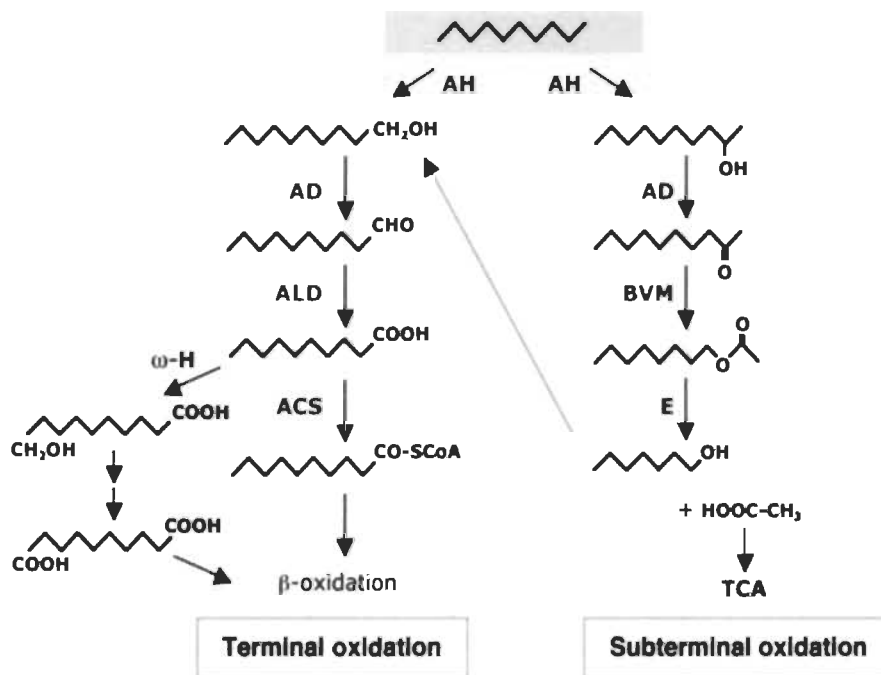
particulière et pourtant sporule normalement, cette enzyme peut ne jouer aucun rôle déterminant dans la sporulation [166].

#### **4.6 Biodiversité enzymatique des huiles usées de moteur**

Vu le milieu extrême dans lequel elles se retrouvent d'origine, les bactéries isolées à partir d'huiles usées de moteur ne démontrent pas une grande variété d'enzymes extracellulaires détectables. Leur capacité de croître et de se développer sur un milieu extrême qui n'est riche qu'en alcanes suggère que ces bactéries ont une machinerie enzymatique restreinte, mais nécessaire pour dégrader ce substrat. La biodégradation microbienne des polluants d'hydrocarbures des huiles usées de moteur utilise les activités enzymatiques de dégradation des hydrocarbures pour effectuer cette activité de dégradation. Lors de la biodégradation de ces composés organiques, les micro-organismes gagnent de l'énergie qui peut être utilisée pour le métabolisme. Ils obtiennent également du carbone (un composant essentiel de tous les constituants cellulaires). Certains microorganismes possèdent la capacité de dégrader des alcanes et/ou des aromatiques [167] [168] [169] [170]. Les microorganismes dans les zones contaminées avec les huiles de moteur s'adaptent en fonction de leur environnement riche en hydrocarbures, ce qui entraîne des mutations génétiques chez les générations suivantes, les préparant ainsi à dégrader leurs hydrocarbures [171] [172]. Une étude d'Atlas et al., 2007 [173], affirme que les microorganismes dégradant les hydrocarbures dans les écosystèmes non pollués constituent moins de 0,1 % de la communauté microbienne pouvant dégrader ces composantes. Toutefois, ce nombre peut augmenter de 1 à 10% pour une population totale dans un environnement pollué par des hydrocarbures pétroliers. Il a été signalé aussi que dans les environnements pollués par les huiles usées de moteur la diversité microbienne globale diminue, il y a donc une pression sélective sur la quantité des bactéries [174] [175].

Ces microorganismes catabolisent les polluants des hydrocarbures pétroliers pour obtenir de l'énergie ou les assimilent à la biomasse cellulaire [176]. Le catabolisme des hydrocarbures a longtemps été considéré comme un processus strictement aérobie [177]

[178]. Ces agents de dégradation aérobies d'alcane (les bactéries en question) utilisent l' $O_2$  comme réactif pour l'activation de la molécule d'alcane [169]. Les enzymes d'activation des alcanes (monooxygénases) surmontent la faible réactivité chimique de l'hydrocarbure en générant des espèces réactives d'oxygène. Le produit généré, un alcool secondaire, est converti en cétone correspondante (Figure 4.5), puis oxydé par une monooxygénase de Baeyer – Villiger pour rendre un ester. L'ester est hydrolysé par une estérase, générant un alcool et un acide gras [179].



**Figure 4.5** Activation des molécules alcane nécessite  $O_2$  comme réactif. **AH**, alkane hydroxylase; **AD**, alcool déshydrogénase; **ALD**, aldéhyde déshydrogénase; **ACS**, acyl-CoA synthetase;  **$\omega$ -H**,  $\omega$ -hydroxylase; **BVM**, Baeyer-Villiger monooxygenase; **E**, esterase; **TCA**, tricarboxylic acids cycle [179].

En ce qui concerne les autres catégories d'enzymes, à savoir les hydrolases et les lignine peroxidases (Annexe B, Tableau B.1), on retrouve un faible nombre de bactéries isolées à partir de ces huiles de moteur qui est capable de produire ces enzymes d'une façon extra-cellulaire. Majoritairement, ce sont les bactéries appartenant au genre *Bacillus* et *Paenibacillus*. L'absence de ces catégories d'enzyme dans la majeure partie de ces espèces isolées dans cette étude est un fait attendu vu que le milieu environnemental utilisé ne renferme pas ces substrats (à savoir la cellulose, les lipides, le xylane).

Ainsi, les bactéries en question n'ont pas développé la machinerie enzymatique nécessaire pour les hydrolyser d'où leur rareté au niveau de la détection.

#### 4.7 Comparaison de la biodiversité enzymatique entre les deux échantillons

Un fait très intéressant à souligner lors de la comparaison de la biodiversité enzymatique, est que pour le même genre bactérien on peut remarquer que certaines activités enzymatiques extracellulaires sont absentes dans les bactéries des HUM par rapport à celles des boues papetières. Alors que ces mêmes activités enzymatiques sont fortement présentes dans les mêmes genres retrouvés dans les boues papetières.

Un autre fait intéressant à noter est qu'aucun autre genre bactérien des souches isolées de la papetière -mis à part, *Bacillus et Paenibacillus*- n'a été capable de pousser sur les milieux minimum contenant de fortes concentrations des HUM. Cela nous ramène sur le fait que la machinerie enzymatique également s'adapte aux conditions de cultures et des milieux dans lesquels se retrouvent les bactéries.

#### 4.8 Dégradation des liqueurs papetières

Les souches bactériennes isolées des boues papetières ont fait l'objet d'un criblage de leur potentiel de croissance sur la liqueur noire, verte et blanche. Ces liqueurs papetières sont des déchets liquides issus de l'industrie Kraft. La liqueur noire est une solution aqueuse composée des résidus de lignine et d'hémicellulose dissous de la pâte à papier, ainsi que d'autres composés chimiques inorganiques utilisés dans le processus de dissolution. Elle contient jusqu'à 65 % – 80 % en lignine [180].

Quant à la liqueur verte, c'est la fusion dissoute de carbonate de sodium, de sulfure de sodium et d'autres composés provenant de la chaudière de récupération dans le procédé Kraft. La liqueur verte réagit habituellement avec la chaux (CaO) pour régénérer la liqueur blanche.

Précisément, le procédé Kraft implique le traitement des copeaux de bois avec un mélange chaud d'eau, d'hydroxyde de sodium, et de sulfure de sodium, connu sous l'appellation « liqueur blanche ». C'est cette liqueur blanche qui va briser les fibres du bois, en séparant la lignine et l'hémicellulose de la cellulose [181].

La croissance des bactéries isolées des boues papetières a été testée en utilisant un milieu Mm auquel on a ajouté des liqueurs papetières comme principale source de carbone (5 % v/v) à différent pH (7 et 12). Plusieurs de ces souches bactériennes se sont développées à un pH de 12 en 48 heures sur un milieu Mm contenant l'une des liqueurs étudiées comme seule source de carbone. Les souches bactériennes étudiées se sont développées sur ce type de gélose et ont décoloré le milieu contenant la liqueur noire. La liqueur noire contient une forte teneur en lignine (> 60 %), en plus des acides organiques et divers sous-produits de dégradation des polysaccharides [163][182]. Dans ce groupe, quinze souches des genres *Pantoea*, *Peaenibacillus*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pneumonia* et *Aeromonas* ont démontré une capacité d'adsorber la couleur noire du milieu en 24 heures, et éventuellement de décolorer les composés responsables de sa couleur foncée. Ce phénomène d'absorption/dégradation est similaire à celui rapporté par Bandounas [183]. Ces souches ont été principalement isolées à partir de boues d'IS, de PS et de MS.

En ce qui concerne les autres types de liqueur, certains genres bactériens (*Peaenibacillus*, *Raoultella* et *Serratia*) ont poussé sur la liqueur verte, mais pas sur les liqueurs noires ou blanches, ce qui suggère que ces souches sont soit adaptées à une teneur en lignine inférieure à celle de la liqueur noire, soit inhibées par les autres composés présents dans la liqueur noire. Ce résultat a été corrélé avec leur activité enzymatique démontrant à son tour l'effet de l'adaptation de la machinerie enzymatique au milieu industriel.

La liqueur blanche est la plus pauvre en source de carbone parmi les trois liqueurs, constituée principalement d'éléments inorganiques ( $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NaOH}$  et  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Seulement une dizaine de souches bactériennes appartenant aux genres *Peaenibacillus*, *Klebsiella*,

*Bacillus*, *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Serratia* et *Pseudoxanthomonas* ont pu croître sur des milieux renfermant la liqueur blanche à 5 % à pH très alcalin 12,0. Des souches appartenant aux genres *Paenibacillus* et *Raoultella* qui étaient incapables de croître et de supporter des concentrations élevées de lignine trouvées dans la liqueur noire ont pu croître sur les autres liqueurs, tandis que d'autres souches et ainsi que les souches isolées de IIS n'ont pas pu croître sur aucune des trois liqueurs.

Cinq souches, *Paenibacillus*, *Bacillus sp*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis* et *Bacillus cereus*, ont pu se développer sur les trois liqueurs, ce qui suggère un degré élevé de résistance aux composés présents dans ce milieu (notamment les composés phénoliques, organiques et minéraux) ainsi que la capacité à métaboliser les composants contenus dans ce dernier. Les bactéries isolées à partir des IIS n'ont montré aucune croissance sur la liqueur noire, tandis que les souches provenant de l'IS ont montré une préférence pour la liqueur noire.

Il est clair qu'un consortium de souches bactériennes de boues sélectionnées pourrait être la clé d'une stratégie efficace de dégradation de la lignine. De plus, le développement d'un tel consortium pourrait aussi être utilisé pour diminuer la couleur associée à la liqueur noire, ce qui ouvrirait de nouveaux horizons pour ces applications.

#### **4.9 Décoloration des colorants industriels (modèles de la lignine)**

La plupart des types de boues contenaient des souches avec des activités ligninolytiques. D'où, l'intérêt de les tester pour leur capacité à décolorer les colorants industriels semblables à la lignine. De nombreuses souches isolées ont également poussé sur des milieux contenant de la liqueur de pâte Kraft comme source unique de carbone. Indépendamment de la grande différence dans la composition des boues, plusieurs souches bactériennes ont la capacité de prospérer en présence de lignine ou des colorants semblables à la lignine, indiquant que cette capacité est fondamentale pour la survie de certaines souches dans un tel environnement. Enfin, cette étude démontre clairement que les bactéries présentes dans une usine de papier Kraft exhibent un potentiel important pour

une utilisation dans des applications industrielles autres que la dégradation de la lignine en tant que tel. On peut citer comme par exemple la décoloration des colorants industriels toxiques et néfastes pour l'environnement et qui sont générés par l'industrie de textile.

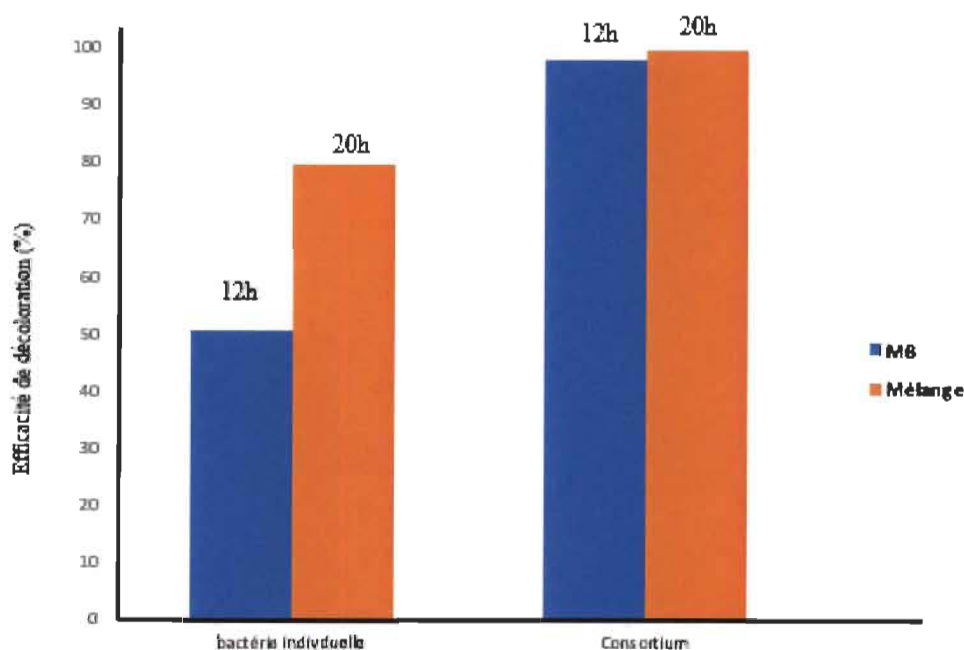
Nous avons testé les souches isolées de la papetière sur un milieu solide contenant quatre différents colorants modèles de la lignine (0,05 % p/v) qui sont également utilisées par les industries: Bleu de méthyle (MB), bleu ciel de Chicago (CSB), vert de méthyle (MG) et bleu brillant Remazol (RBB). Les souches de *Paenibacillus* et *Bacillus* les plus efficaces étaient celles qui décoloraient les colorants après seulement 24 heures d'incubation. Le bleu de méthyle (MB) et le bleu ciel de Chicago (CSB) sont les plus semblables à la lignine en termes de leur structure chimique et conséquemment ont été décolorés par la plupart des souches bactériennes isolées. Cependant, on a remarqué qu'il n'y avait pas de relation étroite entre la capacité de décolorer les colorants industriels et celle de se développer sur les liqueurs papetières.

Dans ce cadre, d'autres phénomènes (à part la dégradation via les enzymes extracellulaires) ont été observés lors de la décoloration bactérienne des colorants. Peu de littérature existe sur ces phénomènes. Dans les champignons, la décoloration du colorant se fait par trois mécanismes différents, comme décrit par Blanca et al [184]. Ceux-ci comprennent i) l'absorption et la concentration du colorant, ii) l'absorption intracellulaire et la dégradation subséquente du colorant et iii) la dégradation extracellulaire du colorant. Nous avons observé des mécanismes similaires pour décolorer ces colorants avec nos souches bactériennes (Figure 2 – Chapitre II).

Cette étude précédente [184] a montré que les colorants (comme RS (rouge) et 10B (bleu), utilisés dans cette étude) pouvaient se lier aux cellules et ensuite être absorbés à l'intérieur. Après compartimentation intracellulaire, le colorant peut être éliminé. Il a été proposé également que certaines protéines puissent jouer un rôle dans ce phénomène, étant donné que ces colorants sont aussi connus par leur capacité de se lier aux protéines de la membrane de la cellule bactérienne [185].

Lors d'une lyse cellulaire, le colorant pourrait être relargué et ainsi pour les industries, il serait judicieux de récupérer un colorant absorbé en cas de déversement par exemple ou pour le recycler. Ceci construit une retombée industrielle très intéressante.

Nous avons par la suite pris avantage de ce résultat retrouvé en milieu solide, en reprenant la même expérience en milieu liquide. Pour ceci, un mélange des quatre colorants industriels étudiés ci-haut (Bleu de méthyle (MB), bleu ciel de Chicago (CSB), vert de méthyle (MG) et bleu brillant Remazol (RBB)) a été ajouté à un milieu minimum. Un consortium préalablement préparé en culture a été inoculé en phase de croissance dans ces milieux renfermant les colorants.



**Figure 4.6** Quantification à haut débit de la décoloration des colorants industriels par le consortium bactérien développé au laboratoire.

L'efficacité de la décoloration obtenue suggère que le consortium formulé à partir de *Bacillus tequilensis* et *Bacillus cereus* est capable d'assurer la décoloration de 80 % du mélange des colorants juste après 20 h de culture. Ce consortium est formulé pour des fins de traitement de colorants industriels pour la première fois dans cette étude (Figure 4.6). La viabilité des bactéries ensemble a été vérifiée et optimisée. Les souches individuelles



ont généré des rendements plus faibles (-50 % en 20 h) d'efficacité de décoloration pour le mélange de colorants industriels (voir annexe A).

#### 4.10 Potentiel de production de polymère intracellulaire PHA

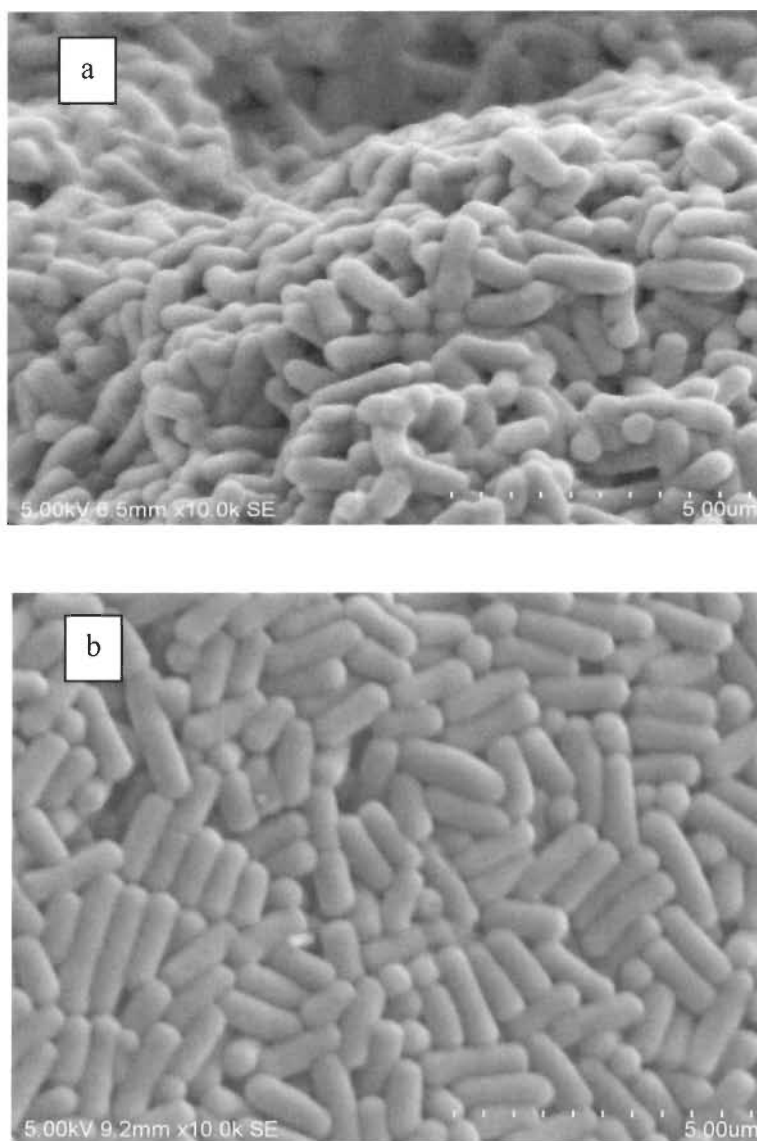
Les déchets industriels comme les boues d'usines de papier Kraft peuvent représenter une source potentielle de matières premières utilisées pour la production de bioplastique (PHA) [165] [186]. Une vingtaine de souches isolées ont produit du PHA tel que déterminé par une double coloration avec le noir du Soudan B et le bleu du Nile A. Parmi ces souches, les meilleurs producteurs sont *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Pseudoxanthomonas* et *Aeromonas* chez les boues papetières. Dix souches bactériennes ne se sont pas développées dans nos conditions d'essai et aucune production de PHA n'a été détectée pour elles. De toutes les souches bactériennes isolées, celles des genres *Bacillus* et *Paenibacillus* présentaient le plus haut degré de coloration avec les colorants révélateurs de PHA et pouvaient présenter ainsi un bon potentiel de production de ce type de bioplastique. *Klebsiella* une souche également testée dans cette étude est connue pour produire du PHA [187] et contrairement au genre *Bacillus*, elle ne sporule pas, ce qui pourrait faciliter l'extraction de ce biopolymère intracellulaire [88]. Selon le meilleur de nos connaissances, *B. amyloliquefaciens* est rapporté pour la première fois dans cette étude pour son potentiel de production de PHA.

L'huile usée de moteur pourrait également être une source potentielle de bactéries pour la production de bioplastiques (PHA). Vingt-trois des souches isolées à partir des HUM ont produit des PHA. Encore une fois, tel que déterminé par double coloration avec le noir du Soudan B et le bleu du Nile A, ces bactéries ont été identifiées comme productrices de PHA. Ces souches bactériennes appartiennent aux genres *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas* et *Rhodococcus*. Les autres souches bactériennes ne se sont pas développées dans nos conditions d'essai (milieu PDA, pH 7,0 et 37 °C) ou pourraient produire des quantités indétectables de PHA dans nos conditions. De toutes les souches testées, celles des genres *Bacillus* et *Paenibacillus* présentaient le plus haut degré de coloration et pouvaient présenter le meilleur potentiel pour la

production de PHA [116]. Habituellement, d'autres types de biomasse sont utilisés pour la production de bioplastiques bactériens comme les lipides, les graisses, l'huile de palme [188] et les boues papetières [186]. À notre connaissance, c'est la première fois que des bactéries sélectionnées à partir d'huile de moteur usagée sont utilisées pour démontrer leur potentiel de production de PHA à partir du glucose.

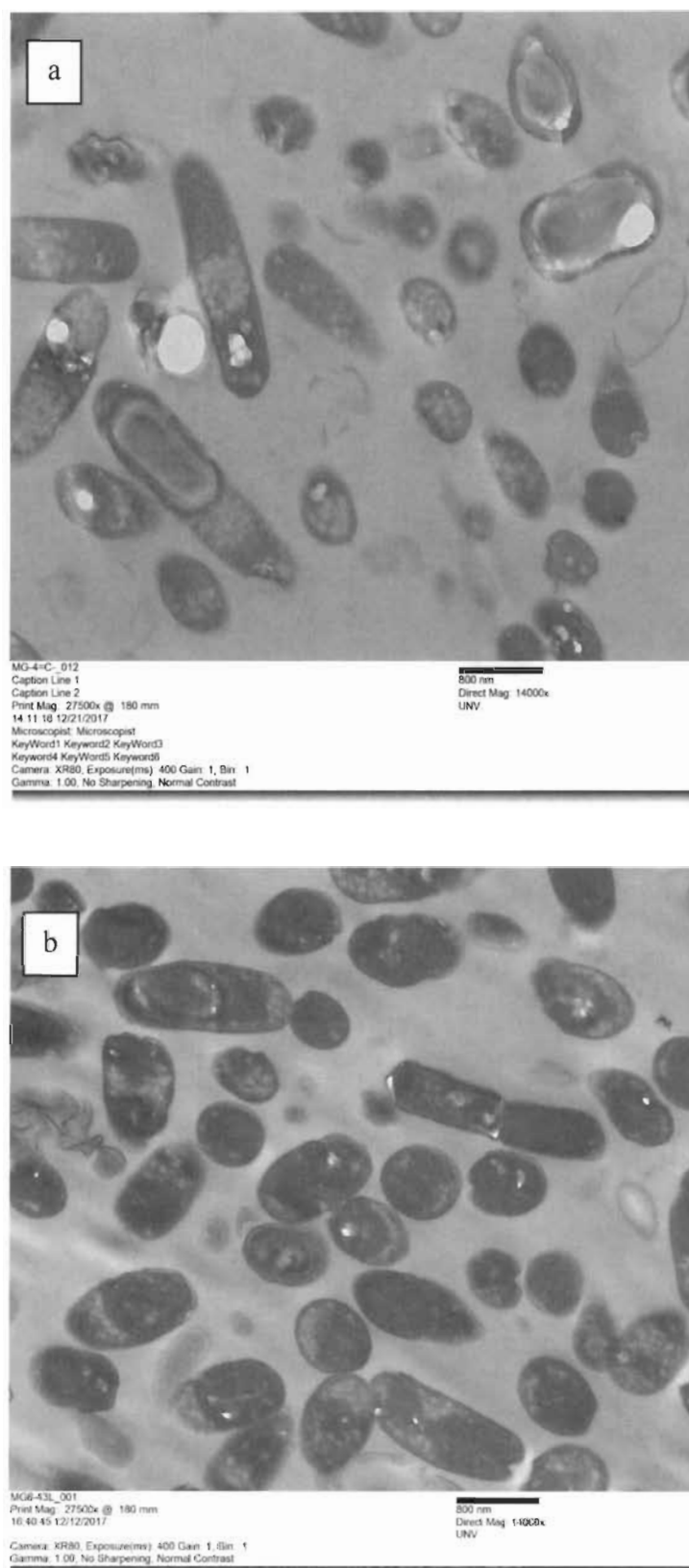
D'ailleurs, nous ne nous sommes pas arrêtés lors de cette étude à l'étude qualitative de ce potentiel très intéressant de la production de bioplastique de type PHA. Nous avons également tenté de quantifier la capacité des deux différentes espèces du genre *Bacillus* à produire du PHA à partir de 5 % de glucose (Annexe A – Figure A.4).

Après optimisation d'une méthode fluorométrique de détection avec le bleu de Nile A, nous avons déterminé que le meilleur producteur de PHA à partir des nos souches est *Bacillus cereus* isolé à partir des boues papetières avec un taux de production 1.88 g PHA/L/h. Comparé à certaines études réalisées précédemment où la productivité du polymère et le coefficient de rendement du substrat étaient 1 g/L/h avec la souche *Zobellella denitrificans*, une souche bactérienne de croissance rapide [92], nous estimons ainsi que notre production est quand même élevée. En outre, il est à noter que l'optimisation de l'extraction aiderait à une meilleure récupération de polyhydroxyalcanoate (PHA).



**Figure 4.7** SEM (Microscopie à balayage électronique) des bactéries productrices de PHA (*Bacillus subtilis*) (a) cultivées en conditions de production de PHA versus (b) en conditions de non-production de PHA (milieu Mm).

L'effet de la production de PHA au niveau morphologie a été étudié. On remarque que la topologie des cellules en conditions de production de PHA change clairement en comparant par rapport aux cellules qui sont dans un milieu contrôle. Les cellules productrices de PHA apparaissent plus larges, plus courbées (montrant des bosses à la surface des cellules) alors que les cellules dans des conditions de non production de PHA sont plus minces et plus affinées et ne représentent pas de topologie distinguée à leur surface (Figure 4.7).



**Figure 4.8** Images TEM (Microscopie à transmission microscopique) des granules de PHA intracellulaire dans *B. cereus* (a) et *B. subtilis* (b).

La TEM a aussi été mise à contribution. Cette méthode nous permet de visualiser les granules de PHA à l'intérieur de la cellule bactérienne. Les granules de PHA sont les vésicules de taille variable (qui peuvent prendre jusqu'à 80 % de la taille de la cellule bactérienne). Elles apparaissent en blanc sur la Figure 4.8 où nous pouvons les localiser à l'intérieur de la cellule bactérienne coupée. Ce sont ces granules qui renferment du PHA.

Après extraction et séchage, nous avons pu vérifier avec FTIR que le polymère extrait correspond au PHA. Cependant cette méthode ne nous permet pas de détecter s'il s'agit du PHB (Poly Hydroxy Butyrate) ou un autre type de PHA.

Il est à noter qu'à notre connaissance, nous avons publié la première production de PHA à partir de souches isolées des huiles de moteur qui soit disponible dans la littérature scientifique.

#### **4.11 Dégradation des alcanes**

En ce qui concerne d'autres souches bactériennes isolées à partir des HUM, nos résultats démontrent la capacité d'un consortium bactérien -que nous avons réussi à mettre au point pour la première fois-, à exhiber un potentiel important, non seulement pour la décontamination des huiles usées de moteur mais également pour produire sous certaines conditions un polymère extracellulaire intéressant.

Dans un premier volet, nos résultats FTIR ont montré une décontamination complète de l'huile usée de moteur lorsqu'un consortium formulé à partir de deux souches bactériennes différentes *Stenotrophomonas* et *Rhodococcus* a été mis en coculture.

L'une des deux principales souches bactériennes identifiées dans notre étude (*Rhodococcus*) a fait l'objet de nombreuses discussions dans le cadre de travaux antérieurs de biorestauration. Cette souche a démontré sa capacité à dégrader les hydrocarbures tels que les benzènes [189]. De plus, des études réalisées sur la dégradation de l'huile pétrochimiques par les isolats de *Stenotrophomonas* et la production d'un biosurfactant

en les utilisant comme substrat [190] ont montré que cette espèce est capable de diminuer significativement la teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques lorsqu'elle est utilisée pour la bioremédiation du pétrole brut. Les deux souches bactériennes que nous avons utilisées dans notre consortium (identifiées comme *Stenotrophomonas* et *Rhodococcus*) ont des systèmes enzymatiques qui leur permettent de dégrader et d'utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone et d'énergie [148]. Cette étude appuie pleinement les recherches antérieures démontrant leur capacité supérieure de dégradation du pétrole [191]. Cependant, dans nos conditions, nous avons constaté qu'il est nécessaire que les deux souches bactériennes soient ensemble en coculture dans le même bouillon supplémenté de 1 % des HUM pour que la biorestauration se produise (que ce soit au niveau visuel : la couleur du milieu devient claire, ou au niveau analytique : la disparition des pics des alcanes détectés par FTIR).

#### **4.12 Potentiel de production de polymère extracellulaire de type EPDM**

Dans un deuxième temps, un fait très intéressant a été observé dans cette étude : nous sommes les premiers à signaler la formation/production d'un biopolymère extracellulaire synthétisé à partir du carbone de l'huile de moteur usée via ce nouveau consortium formulé. Ce polymère formé été caractérisé par FTIR comme étant un polymère de type EPDM (éthylène, propylène, diène-monomère). Un tel élastomère a été utilisé avec succès dans plusieurs applications pendant des décennies, mais il a été synthétisé à partir des produits pétroliers via une transformation chimique. La production de polymère extracellulaire via les bactéries n'est pas un phénomène très fréquent comme la majorité des polymères sont produits intra cellulièrement sous forme de réserve d'énergie pour la cellule bactérienne. Cependant, dans la nature, seulement certaines bactéries (par exemple les bactéries lactiques) produisent des homopolysaccharides comme les dextrans et des hétéropolysaccharides. Les sérotypes de *S. mutans*, qui comprennent *Streptococcus mutans* et *S. sobrinus*, produisent des  $\alpha$ -glucanes solubles et insolubles. Ces derniers peuvent contenir jusqu'à 90 % de liaisons  $\alpha$ -1-3 et possèdent une capacité marquée à favoriser l'adhérence à la surface lisse de la dent causant la plaque dentaire [192].

Toutefois, il n'a pas été trouvé jusqu'à ce jour des études reliées à la production des polymères produits par les bactéries à partir des huiles usées de moteur.

#### 4.12.1 Analyse MS pour identification des enzymes responsables de la production de l'EPDM

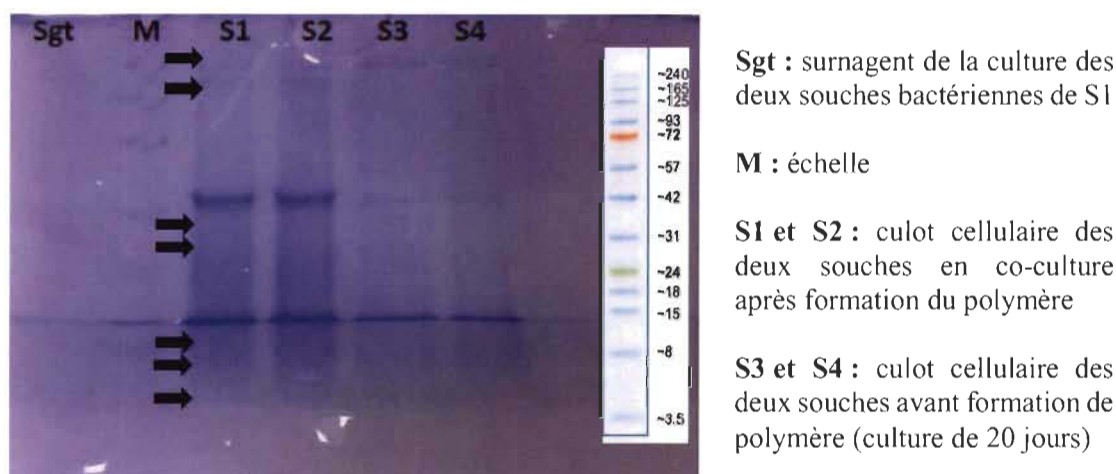
L'analyse par spectrométrie de masse (MS) a été effectuée sur les culots cellulaires obtenus avant et après la formation du biopolymère extracellulaire pour pouvoir détecter la différence entre les protéines produites par le consortium bactérien en question. Pour ce faire, des cultures bactériennes ont été inoculées à une densité optique  $DO_{600}$  finale de 0.6 dans un milieu Mm renfermant 1 % d'huiles de moteur en duplicata. Des prélèvements ont été effectués en continu pour la mesure de la DO alors que deux prélèvements ont été analysés sur gel SDS-PAGE 12 % :

- 1) Le premier prélèvement a été effectué après 20 jours de culture, avant la formation complète et totale du polymère (Figure 4.9).
- 2) Le second prélèvement a été effectué après 36 jours après la formation totale du polymère et que le milieu dans le tube soit devenu blanc clair.



**Figure 4.9** Biopolymère formé (36 jours) versus polymère en cours de production (20 jours).

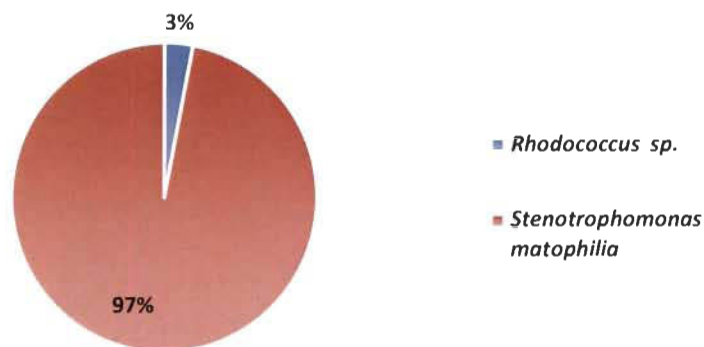




**Figure 4.10** Analyse des protéines par gel SDS-PAGE réalisé sur les cocultures de *Rhodococcus* et *Stenotrophomonas* avant et après formation du biopolymère. Les flèches indiquent les bandes analysées par MS.

L'analyse spectrométrique de masse en tandem MS/MS des protéines produites à la fin de la formation du biopolymère sur les bandes indiquées dans la (Figure 4.10), a généré un résultat final de 597 protéines. Ces protéines sont identifiées selon la base de données Scaffold pour l'analyse du culot cellulaire de la co-culture de *Stenotrophomonas* et *Rhodococcus* dans un milieu renfermant le Mm supplémenté de 1 % HUM. Sur les 597 protéines identifiées 97 % appartenaient à la souche *Stenotrophomonas maltophilia* (Figure 4.11) alors que seulement 3 % de l'ensemble des protéines identifiées appartient à la souche *Rhodococcus sp.* Ce résultat nous amène à conclure que la souche *Stenotrophomonas* a probablement un rôle majeur dans la production du biopolymère extracellulaire assimilé à un EPDM vu le nombre de protéines identifiées et détectées après formation du polymère. Ceci n'exclut pas le fait que la souche *Rhodococcus* pourrait (ou pas) avoir des sécrétions protéiques plus importantes lors de la formation du biopolymère. Ainsi un suivi de la quantité de protéines ou les gènes exprimés au cours du temps sera intéressant dans les travaux futurs. Il est à signaler qu'un décompte de colonies sur boîtes de Pétri refermant la même composition du milieu, a démontré que la souche de *Stenotrophomonas* prend également le dessus en termes de nombre de bactéries afin de former le biopolymère.



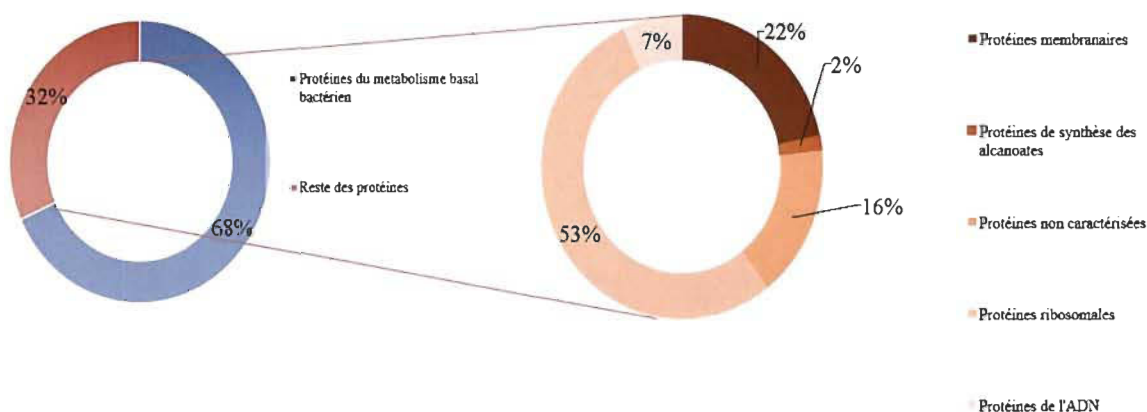


**Figure 4.11** Quantité de protéines en pourcentage produites par souches bactériennes.

Par la suite, la nature ou la fonction des protéines a été analysée pour les deux bactéries. Ainsi, en ce qui concerne le nombre de protéines produites après la formation de biopolymère extracellulaire par la souche *Stenotrophomonas*, on remarque une grande diversité de la machinerie enzymatique. Nous avons divisé les protéines obtenues dans deux grands groupes soit : les protéines du métabolisme basal des bactéries, et le reste des protéines. La grande majorité des protéines identifiées (68 %) se regroupe essentiellement dans la catégorie des protéines du métabolisme basal de la bactérie (ceci renferme tout ce qui est ATPase, Acyl-CoA thioesterase, et les enzymes du métabolisme du glutamate, etc.). Ce sont des protéines qui sont généralement reliées de près ou de loin au cycle de Krebs de la bactérie [193]. Les protéines reliées à l'assimilation du glutamate ont été également produites par la souche *Stenotrophomonas*. L'azote est incorporé dans le glutamate et la glutamine qui forment les principaux donneurs biosynthétiques de tous les autres composants contenant de l'azote dans une cellule. La glutamine est une source d'azote pour la synthèse des purines, des pyrimidines, d'un certain nombre d'acides aminés, de la glucosamine et du p-benzoate, alors que le glutamate fournit l'azote pour la plupart des transaminases. Ces protéines de la voie du glutamate représentent 21 % des protéines identifiées, et seront catégorisées avec les protéines du métabolisme de base.

Les 32 % des protéines restantes renferment une panoplie de fonctions différentes comme les protéines ribosomales (Figure 4.12). Un autre type de protéines a été fortement présent dans cette fraction : ce sont les protéines membranaires intrinsèques et

extrinsèques fortement présentes chez *Stenotrophomonas maltophilia*, par exemple la protéine TolB, et le transporteur de biopolymère ExbB.

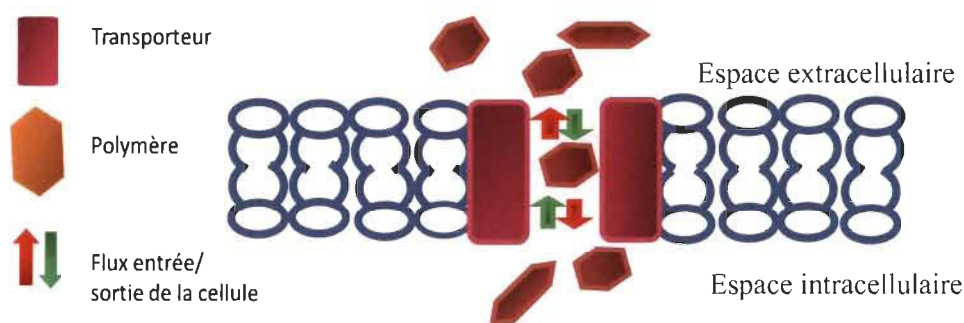


**Figure 4.12** Quantité en pourcentage et identification des protéines produites par *Stenotrophomonas maltophilia*.

Les protéines des membranes bactériennes ont différentes fonctions, selon qu'il s'agisse des membranes spécialisées ou de membranes cytoplasmiques à transport ou aux fonctions de biosynthèse et assemblage de parois et de capsules. Contrairement aux membranes plasmiques qui servent d'organelles biochimiques majeures des bactéries Gram positif et négatif, les membranes externes de ce dernier groupe confèrent des fonctions de barrière aux cellules, fournissant une variété de canaux sélectifs. Il est à noter que chez la souche *E. coli*, les transporteurs analogues au transporteur de polymère ExBb discuté ci-haut sont d'un intérêt majeur, vu qu'ils sont impliqués dans l'absorption de certains composés qui sont de taille plus grande que celle compatible avec la capacité d'un système de transport habituel de la cellule bactérienne [194]. Ceci nous mène à l'hypothèse suivante : les bactéries du genre *Stenotrophomonas* produisent les protéines de transport parce qu'elles sont en train d'absorber des polymères d'alcane du milieu extracellulaire comme source de carbone nécessaire à leur développement ou qu'elles sont en train de sécréter le biopolymère (probablement au fur et à mesure qu'elles en produisent), ou du moins, une partie de biopolymère après sa formation dans la cellule (Figure 4.13).

Curieusement, nous avons détecté des protéines associées à la production des polyhydroxyalcanoates comme la « Polyhydroxyalkanoate granule-associated protein » et la PHA synthase. La présence de ce groupe de protéines suggère qu'il y a une possibilité (très faible) que ces enzymes soient impliquées dans la synthèse de biopolymère [195]. En effet, il n'est pas connu dans la littérature que ces enzymes peuvent être impliquées dans la production d'un biopolymère autre que le PHA.

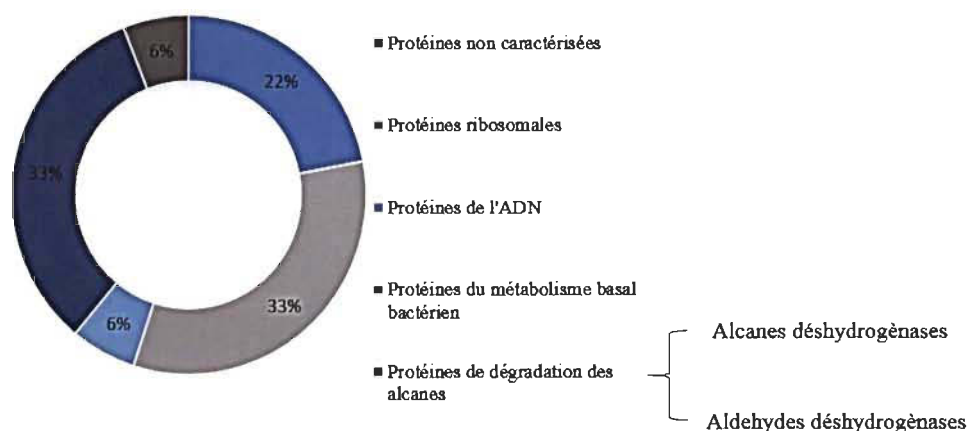
Environ 16 % des protéines restantes restent non caractérisées selon la base de données utilisée. Il se pourrait, que dans ce groupement, on retrouverait des protéines d'intérêt majeur à cette étude, par exemple, des protéines impliquées dans la synthèse des alcanes ou autres (Figure 4.12).



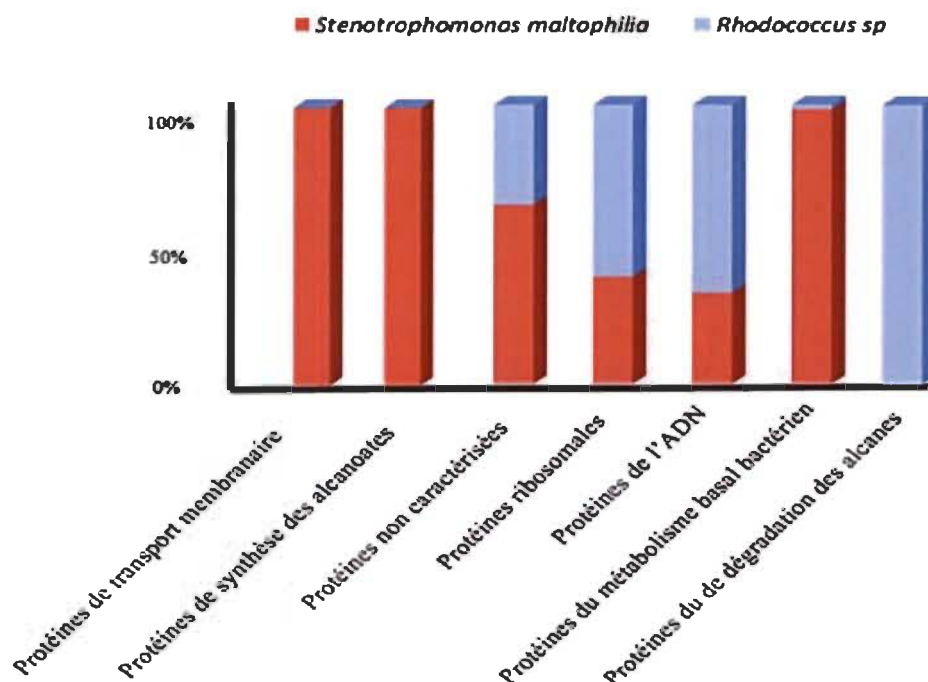
**Figure 4.13** Schéma explicatif du transporteur membranaire de polymère dans une cellule bactérienne.

Dans le cas du genre *Rhodococcus*, pour lequel le total des protéines détectées représentait 3 % des protéines totales, on retrouve majoritairement (33 %) des protéines ribosomales et des protéines du cycle de Krebs (protéines du métabolisme basale). Une fraction de 6 % sont des protéines associées à l'ADN, tandis que 22 % sont des protéines non caractérisées qui pourraient être des protéines d'intérêt pour cette étude. Malheureusement nous ne sommes pas capables de les caractériser dans cette présente étude qui se veut une première étape d'analyse protéomique. Pourtant, nous retrouvons des protéines de dégradation des alcanes chez ce genre bactérien dont la principale est l'alcane déshydrogénase, avec un pourcentage de 6 % vs l'ensemble des protéines trouvées (Figure 4.14). Cette enzyme pourrait être impliquée dans l'assimilation des alcanes présents dans les huiles usées de moteur soit comme source nutritive pour la

bactérie, soit pour faciliter la production du biopolymère par la suite. D'ailleurs, le genre *Rhodococcus* est connu pour son habileté à croître et se développer dans des sites contaminés par les HUM et ces enzymes (discutées ci-haut) ont été trouvées et caractérisées chez cette espèce [196].



**Figure 4.14** Protéines en pourcentage produites par *Rhodococcus sp.*



**Figure 4.15** Comparaison des deux souches (*Rhodococcus* et *Stenotrophomonas*) au niveau de la production des protéines identifiées par groupe de fonction.

Nous pouvons également comparer les protéines produites par les deux souches dans le but de déterminer celles qui sont relatives à *Stenotrophomonas*, mais pas à *Rhodococcus* et vice versa (Figure 4.15). *Stenotrophomonas* semble mieux doté au moment de l'analyse (après formation du polymère) par des protéines membranaires et des protéines de synthèses des alcanates. Pour ce qui est de *Rhodococcus*, cette souche semble responsable de la présence de toutes les protéines dont le rôle dans la dégradation des alcanes est connu (comme les alcanes déshydrogénases). Pour les deux souches, on n'a pas réussi à obtenir l'identification de toutes les protéines, ce qui nous laisse un pool de protéines non caractérisées qui pourraient aussi être importantes pour la compréhension des mécanismes relatifs à la synthèse de ce polymère.

Donc, l'hypothèse que nous formulons sur la base de nos résultats est que : *Rhodococcus* semble être responsable de la dégradation des alcanes tandis que *Stenotrophomonas* semble être actif au niveau de la synthèse de polymère et leur trafic intra/extra-cellulaire. *Rhodococcus* pourrait donc être responsable de fournir des synthons pour la synthèse du biopolymère, qui elle serait accomplie par *Stenotrophomonas*.

## CHAPITRE V

### PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

#### 5.1 Perspectives

Notre étude ouvre des perspectives intéressantes pour des recherches plus avancées et plus spécifiques dans le contexte de la biodégradation et de la bio-valorisation des produits pétroliers. À cet égard, la réalisation des tests d'analyse protéomique peut améliorer les résultats du présent travail en termes d'analyse et d'identification des mécanismes enzymatiques utilisés pour produire le biopolymère.

Une identification des protéines intra et extracellulaires produites par ces bactéries ainsi qu'une comparaison entre les deux serait importante pour comprendre la contribution de la machinerie enzymatique des deux bactéries en question au phénomène observé. En plus d'ouvrir une nouvelle aire de recherche dans la production de polymères extracellulaires bactériens, cette étude montre qu'il est possible de mieux gérer un déchet extrêmement toxique tel que l'huile usée de moteur et de le transformer en produit à haute valeur ajoutée pour l'industrie.

D'autre part, cette recherche nous ouvre des horizons sur l'étude de la biodiversité par le biais de deux différents types de substrats et nous permet de comprendre comment la machinerie cellulaire pourrait varier en changeant les conditions du milieu. C'est en comprenant cette relation bactéries, machinerie enzymatique et environnement, que nous sommes capables de prédire ou expliquer les applications industrielles qui en découlent. Bien qu'on puisse souvent générer des enzymes sur mesure en utilisant l'évolution accélérée, il appert que la compréhension des mécanismes d'adaptation utilisés par les bactéries restera un élément important dans le développement des enzymes industrielles.

## 5.2 Conclusions

Les organismes vivants ou présents dans les échantillons environnementaux assurent ensemble un rôle essentiel dans la formation de ces milieux et leur évolution, ainsi que dans le bon fonctionnement des écosystèmes. Les organismes du sol assurent également des rôles environnementaux essentiels. Il est important dans cette étude de souligner l'importance indéniable de l'étude de la biodiversité pour pouvoir comprendre le fonctionnement de la machinerie enzymatique bactérienne et même réaliser une cartographie de la localisation des enzymes d'intérêt pour l'industrie. Les bactéries représentent une source presque inépuisable de différentes enzymes industrielles et offrent des avantages par rapport à d'autres sources en raison de leur croissance rapide, de leur taux de reproduction et donc de leur vitesse d'évolution, de leurs coûts de production modérés aussi, de leur complexité enzymatique et de leur diversité. Nous avons étudié dans la première partie de cette thèse la communauté bactérienne facilement cultivable retrouvée dans les boues de l'industrie de pâte Kraft et évalué le potentiel de ces isolats pour des applications enzymatiques industrielles. La diversité microbienne et la sécrétion d'enzymes dépendaient de la composition des boues, certains genres étant spécifiques au type de boues échantillonnées. Par exemple, les espèces *Serratia* et *Raoultella* n'ont été trouvées que dans MS, alors que les espèces de *Rahnella* n'ont été trouvées que dans la IS. Les boues de presse (PS) abritaient la communauté bactérienne la plus diversifiée; bon nombre de ces isolats bactériens peuvent tolérer des températures et des pH extrêmes (pH 12). En outre, les souches de PS ont également exprimé le plus grand nombre d'activités enzymatiques hydrolytiques et ligninolytiques, une conséquence possible de la composition dense et très complexe des boues PS. De même, la communauté bactérienne présente dans les boues de machines (MS) était également très diversifiée, bien que ces isolats fussent dépourvus d'activité xylanase, ce qui peut refléter la rareté des fibres de xylane dans ce type de boues. Une gamme diversifiée d'espèces de *Bacillus* englobant une grande variété d'activités enzymatiques a été associée aux quatre échantillons de boues utilisés dans cette étude. La plupart des types de boues contenaient des souches ayant des activités ligninolytiques et la capacité de décolorer les colorants imitant la lignine. Bon nombre des souches isolées se sont également développées sur des milieux contenant de la liqueur de cuisson Kraft comme seule source de carbone. Indépendamment de la

grande différence dans la composition des boues, toutes les souches avaient la capacité de se développer en présence de lignine ou de colorants imitant la lignine, ce qui indique que cette capacité est fondamentale pour survivre dans un tel environnement. Enfin, cette première partie des résultats démontre clairement que les bactéries trouvées dans une usine de papier Kraft ont un potentiel important d'utilisation dans des applications industrielles telles que les bioplastiques, et la biorestauration.

La deuxième partie de cette étude fut consacrée à l'étude des huiles de moteur. Il est à noter que cette étude est la première description des souches bactériennes retrouvées dans une usine de recyclage HUM au Québec, Canada. Les isolats bactériens identifiés, trouvés ici, sont conformes aux études internationales précédentes sur la biodiversité dans le monde entier dont il a été question plus haut. Les souches bactériennes examinées dans le cadre de cette recherche ont montré une résistance à une concentration élevée des huiles usées de moteur pouvant atteindre jusqu'à 20 %, une première. Ainsi, ces bactéries pourraient être pertinentes dans la réduction des écosystèmes qui pourraient être contaminés par des hydrocarbures. En fait, nos résultats de FTIR ont montré une décontamination complète de l'huile usée de moteur lorsqu'un consortium formulé à partir de cette huile est exposé à ces déchets. De plus, nous sommes les premiers à signaler la formation/production d'un biopolymère extracellulaire à partir de ce déchet toxique, caractérisée par FTIR comme étant un polymère EPDM. Cet élastomère a été utilisé avec succès dans plusieurs applications depuis des décennies. Nous avons également souligné pour la première fois le fait que certaines des bactéries isolées de ces déchets (HUM) peuvent produire de la PHA, qui a été détectée par un test de coloration avec SBB et Nile Blue A.

Notre étude ouvre des horizons intéressants pour des recherches plus avancées et plus spécifiques dans le contexte de la biodégradation et de la bio-valorisation des résidus pétroliers comme une cartographie de l'industrie de pâte et papier ou la détection d'un consortium capable de former un biopolymère à partir des HUM. A cet égard, la réalisation de tests d'analyse protéomique pourrait améliorer la portée de ces travaux actuels en termes d'analyse et d'identification des mécanismes enzymatiques utilisés pour produire



ce biopolymère extracellulaire. En outre, il est suggéré de tester d'autres consortiums bactériens des huiles usagées de moteur dans des conditions de culture différente afin de trouver le consortium bactérien le plus efficace pour la biodégradation de la pollution pétrolière.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] W. B. Whitman, D. C. Coleman, and W. J. Wiebe, "Prokaryotes: The unseen majority," 1998.
- [2] P. D. Schloss and J. Handelsman, "Status of the Microbial Census," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 68, no. 4, pp. 686-691, 2004.
- [3] I. A. Marin *et al.*, "Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior.," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 43859, 2017.
- [4] D. Bogaert, R. De Groot, and P. W. M. Hermans, "Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease.," *Lancet. Infect. Dis.*, vol. 4, no. 3, pp. 144-54, Mar. 2004.
- [5] M. C. Horner-Devine, K. M. Carney, and B. J. M. Bohannon, "An ecological perspective on bacterial biodiversity," 2003.
- [6] F. Martin, "Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation."
- [7] R. M. Bowers, A. P. Sullivan, E. K. Costello, J. L. Collett, R. Knight, and N. Fierer, "Sources of Bacteria in Outdoor Air across Cities in the Midwestern United States †," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 18, pp. 6350-6356, 2011.
- [8] T. K. Kim and J. A. Fuerst, "Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches," *Environ. Microbiol.*, vol. 8, no. 8, pp. 1460-1470, Aug. 2006.
- [9] R. Margesin, *Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts*, vol. 13. 2009.
- [10] N. Mesbah and J. Wiegel, "Halophilic thermophiles: a novel group of extremophiles," *Microb. Divers. Curr. Perspect. ...*, vol. 2605, no. Sarkar 1991, pp. 1-38, 2005.
- [11] T. Le Campion-Alsumard, "Les cyanobactéries marines endolithes," *Bull. la Société Bot. Fr. Actual. Bot.*, vol. 136, no. 1, pp. 99-112, Jan. 1989.

- [12] X. Zottig, F. Meddeb-Mouelhi, D. M. Charbonneau, and M. Beauregard, "Characterization of a Novel Alkalophilic Lipase From *Aneurinibacillus thermoaerophilus*: Lid Heterogeneity and Assignment to Family I.5," *Protein J.*, vol. 36, no. 6, pp. 478-488, Dec. 2017.
- [13] W. Yanbo and X. Zirong, "Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities," *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 127, no. 3-4, pp. 283-292, Apr. 2006.
- [14] W. Ludwig and K.-H. Schleifer, "How Quantitative is Quantitative PCR with Respect to Cell Counts?," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 23, no. 4, pp. 556-562, Dec. 2000.
- [15] D. M. Hillis and M. T. Dixon, "Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference," *Q. Rev. Biol.*, vol. 66, no. 4, pp. 411-453, Dec. 1991.
- [16] J. Peccia, E. A. Marchand, J. Silverstein, and M. Hernandez, "Development and application of small-subunit rRNA probes for assessment of selected *Thiobacillus* species and members of the genus *Acidiphilium*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 7, pp. 3065-72, Jul. 2000.
- [17] P. G. F. Grimont, "Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools," *Ann. l'Institut Pasteur/Microbiologie*, vol. 137, no. 1, pp. 165-175, 1986.
- [18] O.-S. Kim *et al.*, "Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 62, no. Pt 3, pp. 716-721, Mar. 2012.
- [19] M. A. Jensen, J. A. Webster, and N. Straus, "Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, no. 4, pp. 945-52, Apr. 1993.
- [20] V. Gurtler and V. A. Stanisich, "New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region," *Microbiology*, vol. 142, no. 1, pp. 3-16, Jan. 1996.
- [21] J. García-Martínez, S. G. Acinas, A. I. Antón, and F. Rodríguez-Valera, "Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity," *J. Microbiol. Methods*, vol. 36, no. 1-2, pp. 55-64, May 1999.
- [22] C. R. Woese, "Bacterial evolution," *Microbiol. Rev.*, vol. 51, no. 2, pp. 221-71, Jun. 1987.

- [23] le Laguerre, S. M. Nour, rie Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin, and lle Amarger, "Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts," 2019.
- [24] P. De Lajudie *et al.*, "Acacia: nodulation et rhizobiums associés," *Dans L'acacia au Sénégal*, no. January, pp. 359-375, 1998.
- [25] T. R. Fritsche, M. Horn, S. Seyedirashti, R. K. Gautom, K. H. Schleifer, and M. Wagner, "In situ detection of novel bacterial endosymbionts of Acanthamoeba spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 206-12, Jan. 1999.
- [26] "Introduction à la métagénomique // Sacha Schutz // bioinformatique génétique médecine." [Online]. Available: <http://dridk.me/metagenomique.html>. [Accessed: 15-Jan-2019].
- [27] J. A. Klappenbach, P. R. Saxman, J. R. Cole, and T. M. Schmidt, "rmdb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 1, pp. 181-4, Jan. 2001.
- [28] T. Maeda, N. Takada, M. Furushita, and T. Shiba, "Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of Vibrio parahaemolyticus," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 192, no. 1, pp. 73-77, Nov. 2000.
- [29] R. A. Forsyth *et al.*, "A genome-wide strategy for the identification of essential genes in Staphylococcus aureus," *Mol. Microbiol.*, vol. 43, no. 6, pp. 1387-1400, Mar. 2002.
- [30] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. A.- Nature, and undefined 1997, "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium Bacillus subtilis," *nature.com*.
- [31] P. M. Watt and I. D. Hickson, "Structure and function of type II DNA topoisomerases," *Biochem. J.*, vol. 303, no. 3, pp. 681-695, Nov. 1994.
- [32] M. Fukushima, K. Kakinuma, and R. Kawaguchi, "Phylogenetic analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli strains on the basis of the gyrB gene sequence.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 8, pp. 2779-85, Aug. 2002.
- [33] H. Sawada, F. Suzuki, I. Matsuda, and N. Saitou, "Phylogenetic Analysis of Pseudomonas syringae Pathovars Suggests the Horizontal Gene Transfer of argK and the Evolutionary Stability of hrp Gene Cluster," *J. Mol. Evol.*, vol. 49, no. 5, pp. 627-644, Nov. 1999.

- [34] K. Watanabe, J. Nelson, S. Harayama, and H. Kasai, "ICB database: the gyrB database for identification and classification of bacteria," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 1, pp. 344-345, Jan. 2001.
- [35] M. A. Yanez, V. Catalán, D. Apráiz, M. J. Figueras, and A. J. Martínez-Murcia, "Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on gyrB gene sequences," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 53, no. 3, pp. 875-883, May 2003.
- [36] F. Sanger *et al.*, "Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.," *Nature*, vol. 265, no. 5596, pp. 687-95, Feb. 1977.
- [37] Principe de la méthode de Sanger - l'Epreuve © UNIL *et al.*, "Séquençage et génome-Napoleome." [Online]. Available: <http://www.napoleome.ch/fr/projet/le-sequençage/>. [Accessed: 10-Sep-2019].
- [38] Z. Liu, T. Z. DeSantis, G. L. Andersen, and R. Knight, "Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 18, pp. e120-e120, Sep. 2008.
- [39] B. Yang, Y. Wang, and P.-Y. Qian, "Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis.," *BMC Bioinformatics*, vol. 17, p. 135, Mar. 2016.
- [40] F. Guo, F. Ju, L. Cai, and T. Zhang, "Taxonomic Precision of Different Hypervariable Regions of 16S rRNA Gene and Annotation Methods for Functional Bacterial Groups in Biological Wastewater Treatment," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e76185, Oct. 2013.
- [41] C. W. Nossa *et al.*, "Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome.," *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 33, pp. 4135-44, Sep. 2010.
- [42] S. Yachi and M. Loreau, "Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 4, pp. 1463-8, Feb. 1999.
- [43] Mayo A.W, "Physical-chemical factors influencing growth and mortality of microorganisms in oxidation ponds," Tohoku university, Sendai, Japan, 1995.
- [44] Y.-J. Deng and S. Y. Wang, "Synergistic growth in bacteria depends on substrate complexity.," *J. Microbiol.*, vol. 54, no. 1, pp. 23-30, Jan. 2016.

- [45] K. E. Dyson *et al.*, “Influence of macrofaunal assemblages and environmental heterogeneity on microphytobenthic production in experimental systems,” *Proceedings. Biol. Sci.*, vol. 274, no. 1625, pp. 2547-54, Oct. 2007.
- [46] M. T. Bulling *et al.*, “Species Effects on Ecosystem Processes Are Modified by Faunal Responses to Habitat Composition,” *Oecologia*, vol. 158. Springer International Association for Ecology, pp. 511-520.
- [47] M. Tokeshi, *Species Coexistence: Ecological and Evolutionary Perspectives*. Wiley, 2009.
- [48] F. De Meirelles Santos Pereira and A. Soares Rosado, “The Combination of Different Carbon Sources Enhances Bacterial Growth Efficiency in Aquatic Ecosystems,” 2014.
- [49] K. Singh, K. Richa, H. Bose, L. Karthik, G. Kumar, and K. V. Bhaskara Rao, “Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus VITRKHB.*,” *3 Biotech*, vol. 4, no. 6, pp. 591-598, Dec. 2014.
- [50] A. M. Chakrabarty, “Bacterial proteins: A new class of cancer therapeutics,” *J. Commer. Biotechnol.*, vol. 18, no. 1, pp. 4-10, 2012.
- [51] B. E. Jones, W. D. Grant, A. W. Duckworth, and G. G. Owenson, “Microbial diversity of soda lakes,” *Extremophiles*, vol. 2, no. 3, pp. 191-200, Aug. 1998.
- [52] Y. Sagiya, H. Yamagata, and S. Udaka, “Direct high-level secretion into the culture medium of tuna growth hormone in biologically active form by *Bacillus brevis*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 42, no. 2-3, pp. 358-363, Nov. 1994.
- [53] P. Solingen *et al.*, “Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycete isolated from an East African soda lake,” *Extremophiles*, vol. 5, no. 5, pp. 333-341, Oct. 2001.
- [54] “Structural Biochemistry/Enzyme - Wikibooks, open books for an open world.” [Online]. Available: [https://en.wikibooks.org/wiki/Structural\\_Biochemistry/Enzyme](https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme). [Accessed: 14-Jan-2019].
- [55] “BRENDA - Information on EC 3.2.1.4 - cellulase.” [Online]. Available: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.4>. [Accessed: 03-Apr-2019].

- [56] “BRENDA - Information on EC 3.2.1.8 - endo-1,4-beta-xylanase.” [Online]. Available: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.8>. [Accessed: 03-Apr-2019].
- [57] A. Jarriault, “Extraction des hémicelluloses de pâtes papetières pour la production de pâte à dissoudre,” p. 232, 2015.
- [58] “BRENDA - Information on EC 2.3.1.B4 - type III polyhydroxybutyrate synthase and Organism(s) Clostridium sp. and UniProt Accession Q9F5P9.” [Online]. Available: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.3.1.B4&UniProtAcc=Q9F5P9&OrganismID=2039>. [Accessed: 03-Apr-2019].
- [59] B. H. A. Rehm, “Polyester synthases: natural catalysts for plastics.,” *Biochem. J.*, vol. 376, no. Pt 1, pp. 15-33, Nov. 2003.
- [60] T. Choinowski, W. Blodig, K. H. Winterhalter, and K. Piontek, “The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the Cβ of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle.,” *J.Mol.Biol.*, vol. 286, pp. 809-827, 1999.
- [61] S. R. Decker *et al.*, “Biomass conversion,” *Handb. Ind. Chem. Biotechnol. Twelfth Ed.*, vol. 2-2, no. July 2012, pp. 1249-1322, 2012.
- [62] W. J. Quax, “Bacterial Enzymes,” in *The Prokaryotes*, New York, NY: Springer New York, 2006, pp. 777-796.
- [63] O. Röhm, “Verfahren zum Reinigen von Wäschestücken aller Art. Patent DE 283923.,” 1915.
- [64] M. Dworkin and S. Falkow, *The prokaryotes. Vol. 6. Proteobacteria: gamma subclass: a handbook on the biology of bacteria*. Springer, 2006.
- [65] “Enzyme Database - BRENDA.” [Online]. Available: <https://www.brenda-enzymes.org/>. [Accessed: 15-Jan-2019].
- [66] “No Title.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer.html>.
- [67] S. Sethi, A. Datta, B. L. Gupta, and S. Gupta, “Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil,” *ISRN Biotechnol.*, vol. 2013, pp. 1-7, Feb. 2013.

- [68] O. Mohand-Oussaid, S. Payot, E. Guedon, E. Gelhaye, A. Youyou, and H. Petitdemange, "The extracellular xylan degradative system in *Clostridium cellulolyticum* cultivated on xylan: evidence for cell-free cellulosome production.," *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 13, pp. 4035-40, Jul. 1999.
- [69] A. O. Falade, O. A. L. Eyisi, L. V Mabinya, U. U. Nwodo, and A. I. Okoh, "Peroxidase production and ligninolytic potentials of fresh water bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifer adhaerens*," *Biotechnol. reports (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 16, pp. 12-17, Dec. 2017.
- [70] "Changement environnemental: les connaissances sont essentielles pour atténuer les effets sur les populations et la nature. Agence européenne pour l'environnement." [Online]. Available: <https://www.eea.europa.eu/fr/articles/changement-environnemental-les-connaissances-sont>. [Accessed: 18-Sep-2018].
- [71] "Chapitre I : Les papetières au Québec/Pâtes et papiers 2001." [Online]. Available: [http://www.environnement.gouv.qc.ca/milieu\\_ind/bilans/pates\\_01/chapitre\\_1.htm#1](http://www.environnement.gouv.qc.ca/milieu_ind/bilans/pates_01/chapitre_1.htm#1). [Accessed: 14-Jan-2019].
- [72] A. Raj, M. M. K. Reddy, R. Chandra, H. J. Purohit, and A. Kapley, "Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus* sp. isolated from sludge of pulp and paper mill," *Biodegradation*, vol. 18, no. 6, pp. 783-792, Oct. 2007.
- [73] P. (Pratima) Bajpai, *Management of pulp and paper mill waste*. .
- [74] S. K. Karn, S. K. Chakrabarty, and M. Sudhakara Reddy, "Characterization of pentachlorophenol degrading *Bacillus* strains from secondary pulp-and-paper-industry sludge," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 64, no. 7, pp. 609-613, Oct. 2010.
- [75] R. C. Kuhad, A. Singh, and K.-E. L. Eriksson, "Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls," Springer, Berlin, Heidelberg, 1997, pp. 45-125.
- [76] M. L. Maki, M. Broere, K. T. Leung, and W. Qin, "Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers.," *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 146-154, 2011.
- [77] S. K. Karn, P. Kumar, and X. Pan, "Extraction of lipase and protease and characterization of activated sludge from pulp and paper industry," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 43, no. 2, pp. 152-162, Jan. 2013.



- [78] E. Desjardins and C. Beaulieu, "Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, no. 3, pp. 141-145, Mar. 2003.
- [79] Rémi Moreau, "Cinquante ans de «marées noires» : radioscopie des catastrophes liées à la pollution par les hydrocarbures," *Insur. Risk Manag.*, vol. 76, no. 1, pp. 99-141, 2008.
- [80] J. E. Kostka *et al.*, "Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 22, pp. 7962-7974, Nov. 2011.
- [81] "BASOL - Ministère de la Transition écologique et solidaire." [Online]. Available: <https://basol.developpement-durable.gouv.fr/>. [Accessed: 14-Jan-2019].
- [82] S. Suni, A.-L. Kosunen, M. Hautala, A. Pasila, and M. Romantschuk, "Use of a by-product of peat excavation, cotton grass fibre, as a sorbent for oil-spills," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 49, no. 11-12, pp. 916-921, Dec. 2004.
- [83] "Code de l'environnement - Article Annexe II de l'article R541-8 | Legifrance." [Online]. Available: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGI TEXT000006074220&idArticle=LEGIARTI000006839995&dateTexte=20120928>. [Accessed: 29-Jan-2019].
- [84] J. A. Amador, A. M. Glucksman, J. B. Lyons, and J. H. Görres, "Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest1," *Soil Sci.*, vol. 162, no. 11, pp. 808-825, Nov. 1997.
- [85] M. . Waldrop, T. . Balser, and M. . Firestone, "Linking microbial community composition to function in a tropical soil," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 32, no. 13, pp. 1837-1846, Nov. 2000.
- [86] P. S. Kourtev, J. G. Ehrenfeld, and M. Häggblom, "Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil," *Ecology*, vol. 83, no. 11, pp. 3152-3166, Nov. 2002.
- [87] A. K. Singh and N. Mallick, "Exploitation of inexpensive substrates for production of a novel SCL-LCL-PHA co-polymer by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, no. 3, pp. 347-354, Mar. 2009.

- [88] R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, and I. Radecka, "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, no. 6, pp. 1437-1449, Jun. 2007.
- [89] G.-Q. Chen, "A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 8, p. 2434, Jul. 2009.
- [90] E. Z. Gomaa, "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 57, no. 1, pp. 145-154, Feb. 2014.
- [91] G.-Q. Chen and Q. Wu, "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials," *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6565-6578, Nov. 2005.
- [92] P.-R. C. Et Hernandez-Raquet, "Polyhydroxyalkanoates: une alternative 'bio' aux plastiques traditionnels," 2017.
- [93] D. Jendrossek and D. Pfeiffer, "New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)," *Environ. Microbiol.*, vol. 16, no. 8, pp. 2357-2373, Aug. 2014.
- [94] D. Jendrossek, "Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes).," *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 10, pp. 3195-202, May 2009.
- [95] J. M. Merrick and M. Doudoroff, "Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by intracellular enzyme system.," *J. Bacteriol.*, vol. 88, pp. 60-71, Jul. 1964.
- [96] J. M. Merrick, D. G. Lundgren, and R. M. Pfister, "morphological changes in poly-beta-hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis.," *J. Bacteriol.*, vol. 89, no. 1, pp. 234-9, Jan. 1965.
- [97] R. J. Griebel and J. M. Merrick, "Metabolism of poly- -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- -hydroxybutyrate granules.," *J. Bacteriol.*, vol. 108, no. 2, pp. 782-9, Nov. 1971.
- [98] M. Zinn, B. Witholt, and T. Egli, "Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 53, no. 1, pp. 5-21, Dec. 2001.
- [99] J. Stubbe, J. Tian, A. He, A. J. Sinskey, A. G. Lawrence, and P. Liu, "Nontemplate-dependent polymerization processes: Polyhydroxyalkanoate Synthases as a Paradigm 1," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, pp. 433-80, 2005.

- [100] B. H. A. Rehm, "Polyester synthases: natural catalysts for plastics," *Biochem. J.*, vol. 376, no. 1, pp. 15-33, Nov. 2003.
- [101] B. H. A. Rehm, "Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 8, pp. 578-592, Aug. 2010.
- [102] L. L. Madison and G. W. Huisman, "Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 63, no. 1, pp. 21-53, Mar. 1999.
- [103] G. W. Haywood, A. J. Anderson, and E. A. Dawes, "A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria," *Biotechnol. Lett.*, vol. 11, no. 7, pp. 471-476, Jul. 1989.
- [104] D. K. Solaiman, R. D. Ashby, and T. A. Foglia, "Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 53, no. 6, pp. 690-4, Jun. 2000.
- [105] G. Zhang, X. Hang, P. Green, K.-P. Ho, and G.-Q. Chen, "PCR cloning of type II polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from two *Pseudomonas* strains," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 198, no. 2, pp. 165-170, May 2001.
- [106] M. F. Vallat, F. Ruch, and M. O. David, "A structural study of EPDM networks—the influence of the crosslinking mode on their microscopic structure," *Eur. Polym. J.*, vol. 40, no. 7, pp. 1575-1586, Jul. 2004.
- [107] O. US EPA, "Managing, Reusing, and Recycling Used Oil."
- [108] R. Vazquez-Duhalt, "Environmental impact of used motor oil.," *Sci. Total Environ.*, vol. 79, no. 1, pp. 1-23, Feb. 1989.
- [109] C. S. Butler and J. R. Mason, "Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases.," *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 38, pp. 47-84, 1997.
- [110] J. L. Mumford, G. E. Hatch, R. E. Hall, M. A. Jackson, R. G. Merrill, and J. Lewtas, "Toxicity of particles emitted from combustion of waste crankcase oil: in vitro and in vivo studies.," *Fundam. Appl. Toxicol.*, vol. 7, no. 1, pp. 49-57, Jul. 1986.
- [111] R. Vazquez-Duhalt and H. Greppin, "Biodegradation of used motor oil by bacteria promotes the solubilization of heavy metals," *Sci. Total Environ.*, vol. 52, no. 1-2, pp. 109-121, Jun. 1986.

- [112] M. S. Prasad and K. Kumari, "Toxicity of Crude Oil to the Survival of the Fresh Water Fish *Puntius sophore* (HAM.)," *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, vol. 15, no. 1, pp. 29-36, 1987.
- [113] "Parce que chaque goutte compte !"
- [114] C. M. Castro-Barros, L. T. Ho, M. K. H. Winkler, and E. I. P. Volcke, "Integration of methane removal in aerobic anammox-based granular sludge reactors," *Environ. Technol.*, vol. 39, no. 13, pp. 1615-1625, Jul. 2018.
- [115] M. Ghribi, F. Meddeb-Mouelhi, and M. Beauregard, "Microbial diversity in various types of paper mill sludge: identification of enzyme activities with potential industrial applications," *Springerplus*, vol. 5, no. 1, 2016.
- [116] N. Altaee, A. Fahdil, E. Yousif, and K. Sudesh, "Recovery and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate from *Rhodococcus equi* cells grown on crude palm kernel oil," *J. Taibah Univ. Sci.*, vol. 10, no. 4, pp. 543-550, Jul. 2016.
- [117] K. Rose and A. Steinbüchel, "Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 6, pp. 2803-12, Jun. 2005.
- [118] K. Temitope Eniola and E. Kit, "Biodegradation of Used Engine Oil By Bacteria Isolated From Soil Contaminated With Used Engine Oil in Ogbomoso, Nigeria Biodegradation work View project Biodegradation studies View project Biodegradation of Used Engine Oil By Bacteria Isolated From Soil Contaminated With Used Engine Oil in Ogbomoso, Nigeria," *IOSR J. Environ. Sci.*, vol. 8, no. 5, pp. 66-70, 2014.
- [119] H. Al Nasrawi, "Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico," *J. Bioremediation Biodegrad.*, vol. 03, no. 04, 2012.
- [120] S. K. Chaerun, K. Tazaki, R. Asada, and K. Kogure, "Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria," *Environ. Int.*, vol. 30, no. 7, pp. 911-922, Sep. 2004.
- [121] H. Al Nasrawi, "Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico," *J. Bioremediation Biodegrad.*, vol. 03, no. 04, pp. 1-6, Apr. 2012.
- [122] J.-L. Li and B.-H. Chen, "Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 1, pp. 76-94, Feb. 2009.

- [123] M. Ebrahimi, M. R. Sarikhani, and R. Fallah, "Assessment of biodegradation efficiency of some isolated bacteria from oil- contaminated sites in solid and liquid media containing oil-compounds," *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 138-147, 2012.
- [124] R. A Beg, M. R. I. Sarker, and M. Pervez, "Production of diesel fuel from used engine oil," *Int. J. Mech. Mech. Eng.*, vol. 10, 2010.
- [125] "How a Quebec program is recycling used oil, and protecting the environment - Canadian Fuels Association." [Online].  
Available: <http://www.canadianfuels.ca/Blog/February-2017/How-a-Quebec-program-is-recycling-used-oil-and-protecting-the-environment/>. [Accessed: 11-Jul-2018].
- [126] K. Das and A. K. Mukherjee, "Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 7, pp. 1339-1345, 2007.
- [127] K. Madhavan Nampoothiri, N. R. Nair, and R. P. John, "An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 22, pp. 8493-8501, 2010.
- [128] E. Montenegro, G. Delabary, M. Silva, F. Andreote, and A. Lima, "Molecular Diagnostic for Prospecting Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacteria," *Bioengineering*, vol. 4, no. 2, p. 52, 2017.
- [129] F. Meddeb-Mouelhi, J. K. Moisan, and M. Beauregard, "A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 66, pp. 16-19, 2014.
- [130] G. Kumar *et al.*, "Bioremediation of petrol engine oil polluted soil using microbial consortium and wheat crop," *J. Pure Appl. Microbiol.*, vol. 11, no. 3, 2017.
- [131] R. Abu-Ellella, M. E. Ossman, R. Farouq, and M. Abd-Elfatah, "Used Motor Oil Treatment : Turning Waste Oil Into Valuable Products," *Int. J. Chem. Biochem. Sci.*, vol. 7, no. August, pp. 57-67, 2015.
- [132] A. Wentzel, T. E. Ellingsen, H.-K. Kotlar, S. B. Zotchev, and M. Throne-Holst, "Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 76, no. 6, pp. 1209-1221, Sep. 2007.

- [133] Y. S. Goh and I. K. P. Tan, "Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island," *Microbiol. Res.*, vol. 167, no. 4, pp. 211-219, Apr. 2012.
- [134] T. Kato, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya, "Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 91, no. 1, pp. 64-70, 2001.
- [135] N. Altaee, A. Fahdil, E. Yousif, and K. Sudesh, "Recovery and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate from *Rhodococcus equi* cells grown on crude palm kernel oil," *J. Taibah Univ. Sci.*, vol. 10, no. 4, pp. 543-550, 2016.
- [136] Sukumar and Nirmala P, "Screening of diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soil," *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, vol. 3, no. 8, pp. 18-22, 2016.
- [137] J.-L. Li and B.-H. Chen, "Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 1, pp. 76-94, Feb. 2009.
- [138] R. Gurav, H. Lyu, J. Ma, J. Tang, Q. Liu, and H. Zhang, "Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 12, pp. 11392-11403, 2017.
- [139] P. Nirmala, "International Journal of Advanced Research in Biological Sciences Screening of diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soil," vol. 3, no. 8, pp. 18-22, 2016.
- [140] K. Santhini, J. Myla, S. Sajani, and G. Usharani, "Screening of *Micrococcus* Sp from Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation," *Bot. Res. Int.*, vol. 2, no. 4, pp. 248-252, 2009.
- [141] T. Kato, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya, "Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 91, no. 1, pp. 64-70, 2001.
- [142] C. A. Nicholson and B. Z. Fathepure, "Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 1222-5, Feb. 2004.

- [143] I. M. Head, D. M. Jones, and S. R. Larter, "Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil," *Nature*, vol. 426, no. 6964, pp. 344-352, 2003.
- [144] O. P. Abioye, P. Agamuthu, and A. R. Abdul Aziz, "Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments," *Biotechnol. Res. Int.*, vol. 2012, pp. 1-8, 2012.
- [145] K. B. Anish, S. Gulab, K. A. Neeraj, G. Varsha, and Y. Anita, "Isolation and screening of Polyhydroxybutyrate producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes," *Int J Biomat.*, vol. 1155, 2013.
- [146] B. Singh Saharan, A. Grewal, and P. Kumar, "Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments," *Chinese J. Biol.*, vol. 2014, pp. 1-18, 2014.
- [147] P. K. S. Virupakshappa, M. B. Krishnaswamy, G. Mishra, and M. A. Mehkri, "Optimization of Crude Oil and PAHs Degradation by *Stenotrophomonas rhizophila* KX082814 Strain through Response Surface Methodology Using Box-Behnken Design," *Biotechnol. Res. Int.*, vol. 2016, pp. 1-13, 2016.
- [148] A. L. Juhasz, G. A. Stanley, and M. L. Britz, "Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003.," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 30, no. 5, pp. 396-401, May 2000.
- [149] A. U. Paeglis, "A Simple Model for Predicting Heat Aging of EPDM Rubber," *Rubber Chem. Technol.*, vol. 77, no. 2, pp. 242-256, May 2004.
- [150] S. Shaw and R. P. Singh, "Studies on impact modification of polystyrene (PS) by ethylene-propylene-diene (EPDM) rubber and its graft copolymers. II. PS/EPDM-g-(styrene-co-methylmethacrylate) blends," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 40, no. 56, pp. 693-699, Sep. 1990.
- [151] D. A. Jackson, J. T. Koberstein, and R. A. Weiss, "Small-angle X-ray scattering studies of zinc stearate-filled sulfonated poly(ethylene-co-propylene-co-ethylidene norbornene) ionomers," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 37, no. 21, pp. 3141-3150, Nov. 1999.
- [152] P. Singh and N. Parmar, "Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria," *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 24, pp. 4907-4919, 2011.

- [153] P. H. F. Pereira *et al.*, "Vegetal fibers in polymeric composites: a review," *Polímeros*, vol. 25, no. 1, pp. 9-22, Feb. 2015.
- [154] P. Devi and A. K. Saroha, "ICGSEE-2013[14 th-16 th March 2013] International Conference on Global Scenario in Environment and Energy Effect Of Temperature On Biochar Properties During Paper Mill Sludge Pyrolysis."
- [155] Magda El-bendary, "Petroleum oil biodegradation potential of some isolated bacteria from Saudi Arabia," *J. Food, Agric. Environ. Vol.15 (3&4), July-O*, pp. 92-97, 2017.
- [156] L. U. Obi, H. I. Atagana, and R. A. Adeleke, "Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria.," *Springerplus*, vol. 5, no. 1, p. 1946, 2016.
- [157] J. Jin, J. Yao, W. Liu, Q. Zhang, and J. Liu, "Fluoranthene degradation and binding mechanism study based on the active-site structure of ring-hydroxylating dioxygenase in *Microbacterium paraoxydans* JPM1," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 363-371, Jan. 2017.
- [158] E. A. Diab, "Screening Bacterial Strains Isolated from Used Motor oil-Polluted Desert Soil for the production of Biosurfactants and the Possibility of Applying the Produced Biosurfactants for Washing and Bioremediation of the Polluted Soil," vol. 4, no. 8, pp. 887-895, 2015.
- [159] A. M. Earl *et al.*, "Whole-Genome Sequences of *Bacillus subtilis* and Close Relatives," *J. Bacteriol.*, vol. 194, no. 9, pp. 2378-2379, May 2012.
- [160] A. Sharma and T. Satyanarayana, "Comparative Genomics of *Bacillus* species and its Relevance in Industrial Microbiology," *Genomics Insights*, vol. 6, p. GEI.S12732, Jan. 2013.
- [161] M. Hofrichter, "Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, no. 4, pp. 454-466, Apr. 2002.
- [162] R. Kumar, S. Singh, and O. V. Singh, "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 5, pp. 377-391, May 2008.
- [163] A. T. Martínez *et al.*, "Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.," *Int. Microbiol.*, vol. 8, no. 3, pp. 195-204, Sep. 2005.



- [164] F. G. Priest, "Regulation of Extracellular Enzyme Synthesis in Bacilli," in *Extracellular Enzymes of Microorganisms*, Boston, MA: Springer US, 1987, pp. 3-12.
- [165] F. G. Priest, "Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*," *Bacteriol. Rev.*, vol. 41, no. 3, pp. 711-53, Sep. 1977.
- [166] C. Coleman and S. Brown, "Relationship between exoprotease secretion and the synthesis of ribonucleic acid and protein in *Bacillus amyloliquefaciens*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 7, no. 6, pp. 840-4, Jun. 1975.
- [167] S. Boonchan, M. L. Britz, and G. A. Stanley, "Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 3, pp. 1007-19, Mar. 2000.
- [168] K. S. M. Rahman, T. J. Rahman, P. Lakshmanaperumalsamy, R. Marchant, and I. M. Banat, "The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons," *Acta Biotechnol.*, 2003.
- [169] R. U. Meckenstock *et al.*, "Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 1-3, pp. 92-118, 2016.
- [170] S. J. Varjani and V. N. Upasani, "Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514," *Bioresour. Technol.*, vol. 222, pp. 195-201, Dec. 2016.
- [171] R. J. Watkinson and P. Morgan, "Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms," *Biodegradation*, vol. 1, no. 2-3, pp. 79-92, 1990.
- [172] I. R. McDonald *et al.*, "Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 255, no. 2, pp. 225-232, Feb. 2006.
- [173] R. M. Atlas, "Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 52, no. 2, pp. 149-156, Apr. 2007.
- [174] R. M. Atlas, "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective," *Microbiol. Rev.*, vol. 45, no. 1, pp. 180-209, Mar. 1981.
- [175] J. Aislabie, D. J. Saul, and J. M. Foght, "Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils," *Extremophiles*, vol. 10, no. 3, pp. 171-179, Jun. 2006.

- [176] J. G. Leahy and R. R. Colwell, "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.," *Microbiol. Rev.*, vol. 54, no. 3, pp. 305-15, Sep. 1990.
- [177] F. Widdel and R. Rabus, "Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons.," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 12, no. 3, pp. 259-76, Jun. 2001.
- [178] F. Abbasian, R. Lockington, M. Mallavarapu, and R. Naidu, "A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 176, no. 3, pp. 670-699, Jun. 2015.
- [179] F. Rojo, "Degradation of alkanes by bacteria," *Environ. Microbiol.*, vol. 11, no. 10, pp. 2477-2490, Oct. 2009.
- [180] W. Zhu and H. Theliander, "Lignin precipitation," 2015.
- [181] E. Sjöström, *Wood chemistry : fundamentals and applications*. .
- [182] S. L. Mathews, A. S. Ayoub, J. Pawlak, and A. M. Grunden, "Methods for Facilitating Microbial Growth on Pulp Mill Waste Streams and Characterization of the Biodegradation Potential of Cultured Microbes," *J. Vis. Exp.*, no. 82, p. e51373, Dec. 2013.
- [183] L. Bandounas, N. J. Wierckx, J. H. de Winde, and H. J. Ruijsenaars, "Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential," *BMC Biotechnol.*, vol. 11, no. 1, p. 94, Oct. 2011.
- [184] B. E. Barragán, C. Costa, and M. Carmen Márquez, "Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media," *Dye. Pigment.*, vol. 75, no. 1, pp. 73-81, Jan. 2007.
- [185] D. K. Sahoo and R. Gupta, "Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent."
- [186] H. Satoh, Y. Iwamoto, T. Mino, and T. Matsuo, "Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic," *Water Sci. Technol.*, vol. 38, no. 2, pp. 103-109, Jan. 1998.
- [187] S. Tufail, S. Munir, and N. Jamil, "Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons.," *Braz. J. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 629-636, 2017.

- [188] R. A. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, Z. Piotrowska-Seget, and I. K. Radecka, "Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*," *AMB Express*, vol. 1, no. 1, p. 11, Jun. 2011.
- [189] S. Jorfi, A. Rezace, N. A. Jaafarzadeh, A. Esrafil, H. Akbari, and G. A. Moheb Ali, "Bioremediation of Pyrene-Contaminated Soils Using Biosurfactant," *Jentashapir J. Heal. Res.*, vol. 5, no. 5, 2014.
- [190] I. A. Larik, M. A. Qazi, A. H. Phulpoto, A. Haleem, S. Ahmed, and N. A. Kanhar, "Stenotrophomonas maltophilia strain 5DMD: an efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil," *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, vol. 16, no. 1, pp. 259-268, Jan. 2019.
- [191] A. N. L, O. C. O. G, and N. N. R, "Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*," *African J. Biotechnol.*, vol. 7, no. 12, pp. 1939-1943, 2008.
- [192] J. Cerning, "Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 87, no. 1-2, pp. 113-130, Sep. 1990.
- [193] C. T. Gray, J. W. Wimpenny, and M. R. Mossman, "Regulation of metabolism in facultative bacteria: II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 117, no. 1, pp. 33-41, Mar. 1966.
- [194] H. Celia *et al.*, "Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction," *Nature*, vol. 538, pp. 60-65, 2016.
- [195] M. F. Chek *et al.*, "Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 5312, Dec. 2017.
- [196] T. M. Luong *et al.*, "Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 2, p. 20, Feb. 2018.

## ANNEXE A

### LES BOUES PAPETIÈRES

Les figures et tableaux de l'annexe seront organisés par ordre dans le texte et les articles.

**Tableau A.1**

Liste des principales enzymes utilisées en industrie

Industry	Enzyme class	Application
Detergent (laundry and dish wash)	Protease Amylase Lipase Cellulase Mannanase	Protein stain removal Starch stain removal Lipid stain removal Cleaning, color clarification, anti-redeposition (cotton) Mannanan stain removal (reappearing stains)
Starch and fuel	Amylase Amyloglucosidase Pullulanase Glucose isomerase Cyclodextrin-glycosyltransferase Xylanase	Starch liquefaction and saccharification Saccharification Saccharification Glucose to fructose conversion Cyclodextrin production Viscosity reduction (fuel and starch)
Food (including dairy)	Protease Protease Lipase Lactase Pectin methyl esterase Pectinase Transglutaminase	Protease (yeast nutrition – fuel) Milk clotting, infant formulas (low allergenic), flavor Cheese flavor Lactose removal (milk) Firming fruit-based products Fruit-based products Modify visco-elastic properties
Baking	Amylase Xylanase Lipase Phospholipase Glucose oxidase Lipoxygenase Protease Transglutaminase	Bread softness and volume, flour adjustment Dough conditioning Dough stability and conditioning ( <i>in situ</i> emulsifier) Dough stability and conditioning ( <i>in situ</i> emulsifier) Dough strengthening Dough strengthening, bread whitening Biscuits, cookies Laminated dough strengths
Animal feed	Phytase Xylanase ( $\beta$ )-Glucanase	Phytate digestibility – phosphorus release Digestibility Digestibility
Beverage	Pectinase Amylase ( $\beta$ )-Glucanase Acetolactate decarboxylase	De-pectinization, mashing Juice treatment, low calorie beer Mashing Maturation (beer)
Textile	Laccase Cellulase Amylase Pectate lyase Catalase Laccase Peroxidase	Clarification (juice), flavor (beer), cork stopper treatment Denim finishing, cotton softening De-sizing Scouring Bleach termination Bleaching Excess dye removal
Pulp and paper	Lipase Protease Amylase Xylanase Cellulase	Pitch control, contaminant control Biofilm removal Starch-coating, de-inking, drainage improvement Bleach boosting De-inking, drainage improvement, fiber modification
Fats and oils	Lipase Phospholipase	Transesterification De-gumming, lyso-lecithin production
Organic synthesis	Lipase Acyase Nitrilase	Resolution of chiral alcohols and amides Synthesis of semisynthetic penicillin Synthesis of enantiopure carboxylic acids
Leather	Protease Lipase	Unhearing, bating De-picking
Personal care	Amyloglucosidase Glucose oxidase Peroxidase	Antimicrobial (combined with glucose oxidase) Bleaching, antimicrobial Antimicrobial

Cette liste est plus détaillée puisqu'elles exhibent les différentes applications en détails des enzymes utilisées dans cette étude (à savoir cellulase, laccase, peroxidase, xylanase, CMCase, etc.)

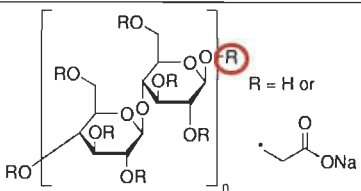
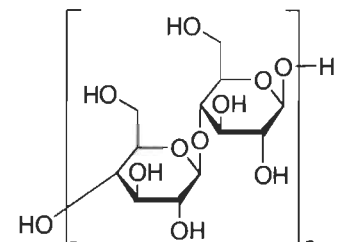
Tableau A.2

Tableau descriptif des bactéries extrêmophiles et leurs applications industrielles

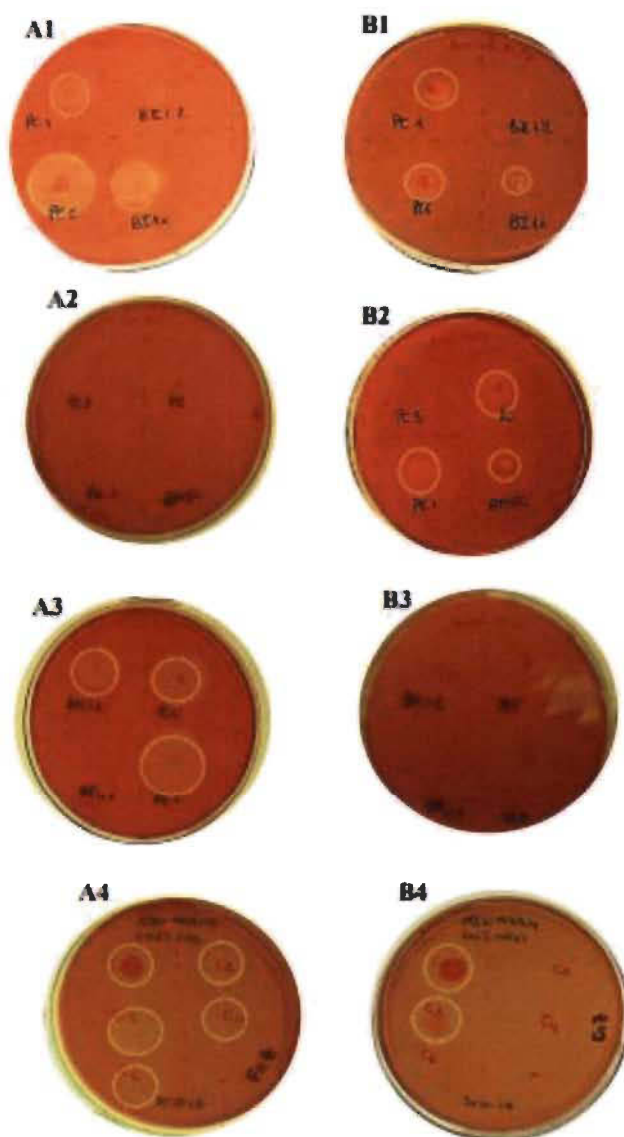
Type	Growth characteristics	Enzymes	Applications
Thermophiles	Temp > 80°C (Hyperthermophile) and 60-80°C (Thermophile)	proteases	Detergents, hydrolysis in food and feed, brewing, baking
		Glycosyl hydrolases (e.g. amylases, pullulanase, glucoamylases, glucoisidases, cellulases, xylanases)	Starch, cellulose, chitin, pectin processing, textiles
		Chitinases	Chitin modification for food and health products
		Nylanases	Paper bleaching
		Lipases, esterases	Detergents, stereo-specific reactions (e.g., trans-esterification, organic biosynthesis)
		DNA polymerases	Molecular biology (e.g., PCR)
		Dehydrogenases	Oxidation reactions
Psychrophiles	Temp < 15°C	Proteases	Detergents, food applications (e.g., dairy products)
		Amylases	Detergents and bakery
		Cellulases	Detergents, feed and textiles
		Dehydrogenases	Biosensors
		Lipases	Detergents, food and cosmetics
Halophiles	High salt, (e.g., 2-5 M NaCl)	Proteases	Peptide synthesis
		Dehydrogenases	Biocatalysis in organic media
Alkaliphiles	pH > 9	Proteases, cellulases	Detergents, food and feed
Acidophiles	pH < 2-3	Amylases, glucoamylases	Starch processing
		Proteases, cellulases	Feed component
		Oxidases	Desulfurization of coal
Piezophiles	Pressure-loving, up to 130 MPa	To be defined	Food processing and antibiotic production

**Tableau A.3**

Structures et caractéristiques physiques des substrats PASA and CMC cellulose [22]

Substrat	Structure	Solubilité	DP	PM (g/mol)	DS	CrI <sup>c</sup>	SSA (m <sup>2</sup> /g)
CMC		Soluble	400	90	0.65-0.90	0	NA
PASA		Insoluble	96	15.570	NA	0.00–0.04	240

DP : Degré de polymérisation ; PM : Poids moléculaire; DS : Degré de substitution ; CrI : Index de cristallinité; SSA : Aire de surface spécifique; PASA: Phosphoric Acid Swollen Avicel; CMC: Carboxymethyl cellulose; NA: Not available

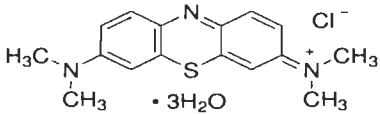
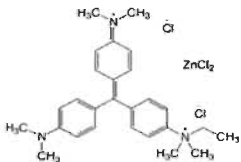
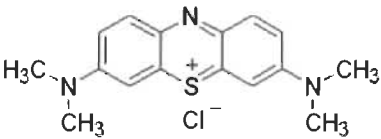
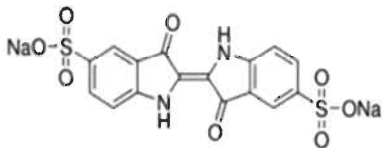
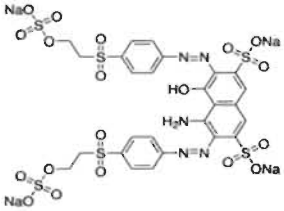
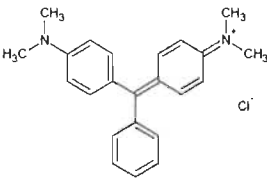
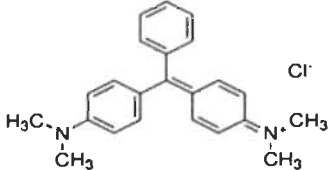


**Figure A.1** Zones claires aux alentours des colonies montrant la détection de l'activité enzymatique des souches bactériennes isolées cellulases et de l'activité enzymatique des enzymes cellulases commerciales (C1 à C6) (A4 et B4) sur plaques de gélose supplémentées avec 0,1 % de CMC (A1 à A4) et 0,1 % de PASA (B1 à B4) comme substrat.

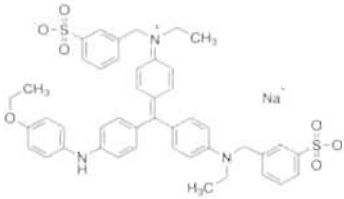
Les activités CMCase et PASAase ont été détectées à pH 7 et 37 °C après incubation 24 h pour la souche bactérienne (A1 à A3 et B1 à B3) et 4 heures pour la souche commerciale. La détection des activités enzymatiques est effectuée avec le rouge Congo.

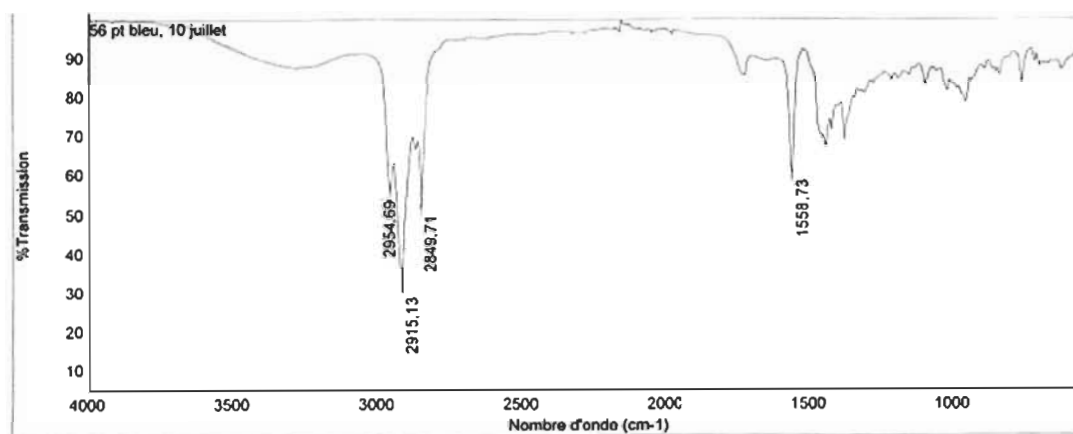
Tableau A.4

Noms des colorants industriels utilisés pour les tests de décoloration  
via les bactéries et leur structure chimique relative

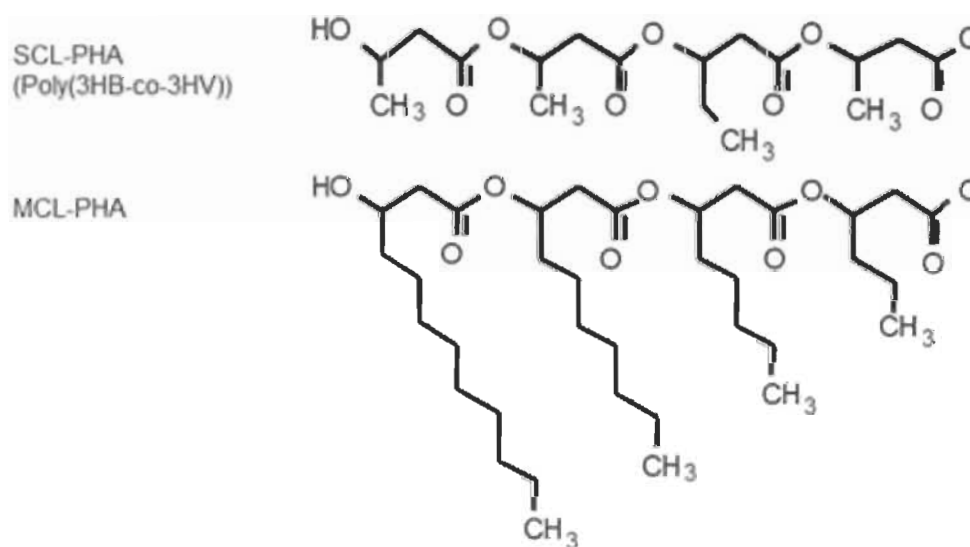
Structure des colorants	Noms des colorants
	Indigo Carmine (IC)
	Vert de méthyle (MG)
	Bleu de méthylène (MB)
	Bleu « Chicago sky » (CSB)
	Réactive Black 5 (RB-5)
	Vert de malachite (MaG)
	Poly Réactive 478 (PR-478)



Structure des colorants	Noms des colorants
	Rémazol Brilliant bleu (RBB)



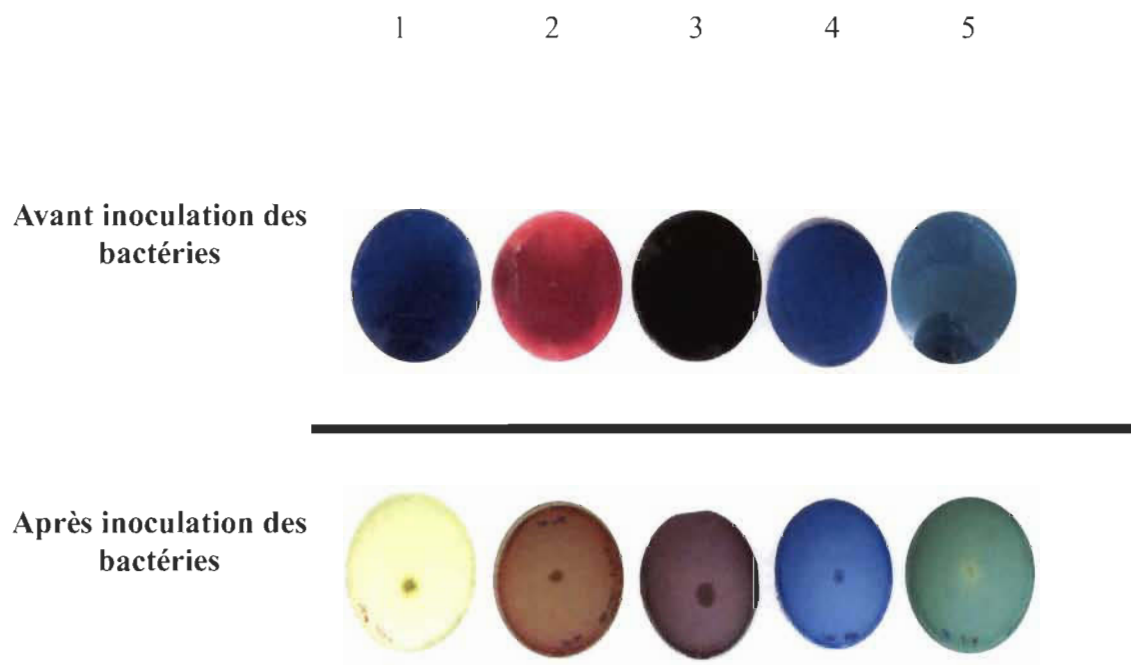
**Figure A.2** Analyse du type (PHA) de la souche *Bacillus cereus* après une extraction au chloroforme.



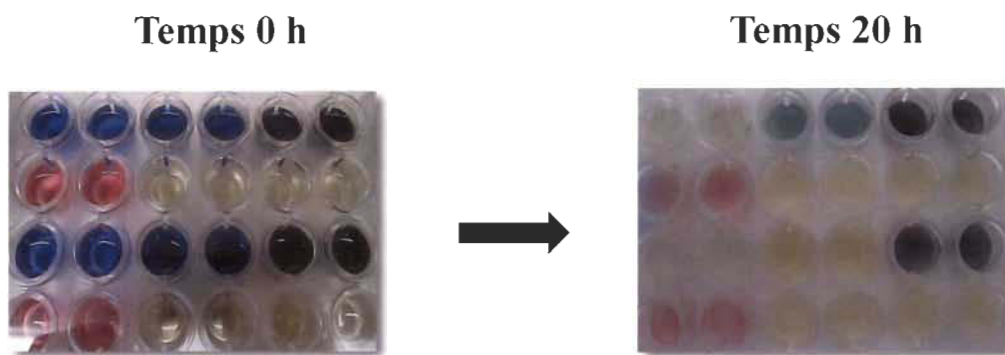
**Figure A.3** Structures des types de PHA produits (chaîne courte/moyenne) [191].

**Tableau A.5**

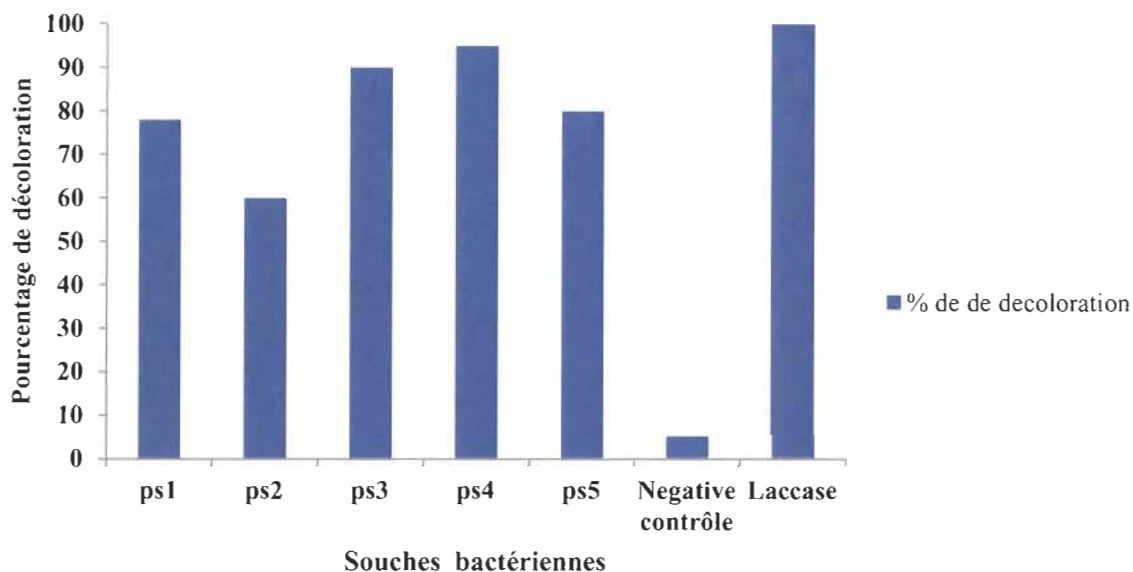
Décoloration des colorants industriels modèles de lignine utilisés pour cette étude



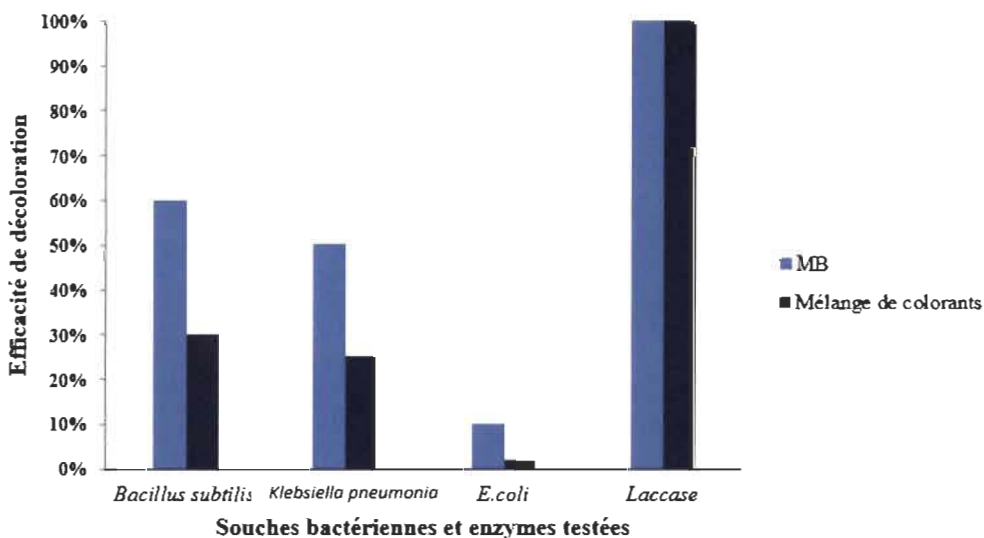
**Figure A.4** Décoloration des colorants industriels via les bactéries isolées de la papetière à 37 °C, pH7 après 24 h d'incubation, respectivement : 1 : MB, 2 : PR-478, 3 : CSB, 4 : RBB, 5 : Indigo Carmin.



**Figure A.5** Quantification à haut débit de la décoloration des colorants industriels après 20 h d'incubation.



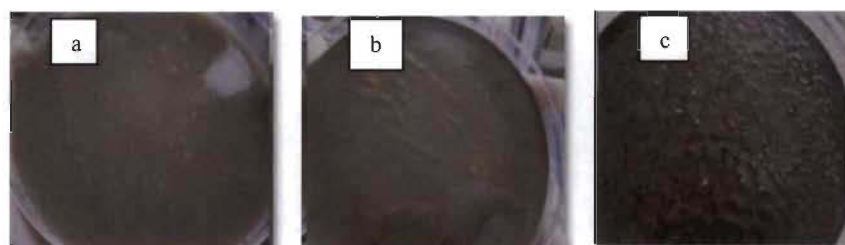
**Figure A.6** % de décoloration de MB (bleu de méthylène) des bactéries de la papetière après 24 h de biotraitement, en comparaison avec un control *E. coli* et la laccase de *Tremetes Versicolor* en tant que control positif après 20 h. Efficacité de la décoloration :  $(DO_i - DO_f) / DO_i$ .



**Figure A.7** Comparaison de l'efficacité de décoloration des 3 bactéries dont deux isolées des boues papetières (*Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumonia*) une bactérie contrôle négative *E. coli* et une enzyme commerciale de type Laccase de *Tremates versicolor*.

## ANNEXE B

### LES HUILES USÉES DE MOTEUR



**Figure B.1** Bactéries capables de pousser sur Mm supplémenté de 10 % HUM (a, b) et bactéries résistant et poussent sur Mm + 20 % HUM (c).

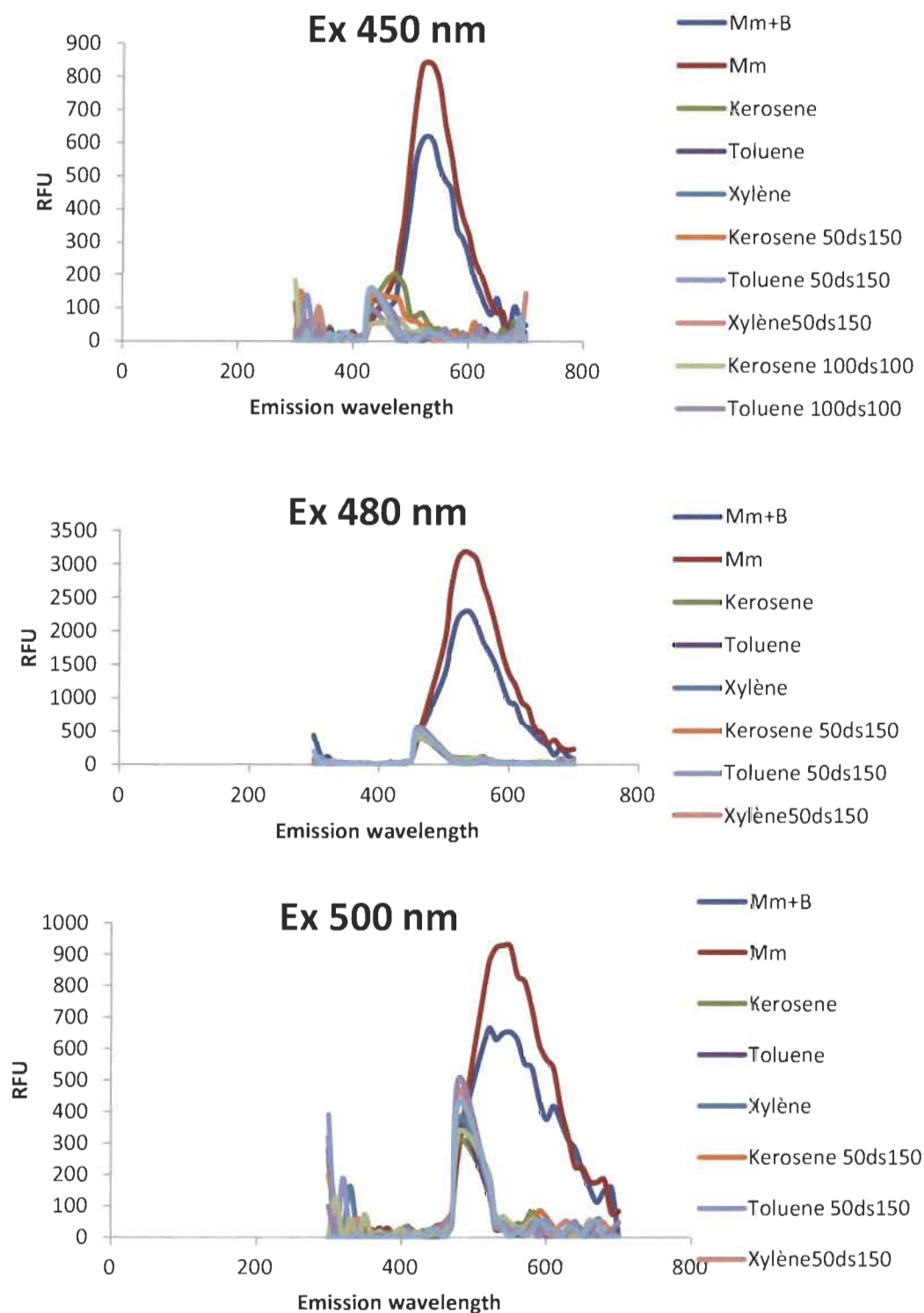
**Tableau B.1** Les activités enzymatiques détectées chez les bactéries isolées des HUM

Identification des souches	Gram	Est	Lip	CMC	PASA	Xyl	Amyl	Prot	LiP	MnP	Lac	Oxy
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Raoultella terrigena</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Raoultella terrigena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Raoultella terrigena</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium sp.</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+

Identification des souches	Gram	Est	Lip	CMC	PASA	Xyl	Amyl	Prot	LiP	MnP	Lac	Oxy
<i>Klebsiella sp.</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Microbacterium sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Microbacterium sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Rhodococcus sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-		+		+	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-		+			+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

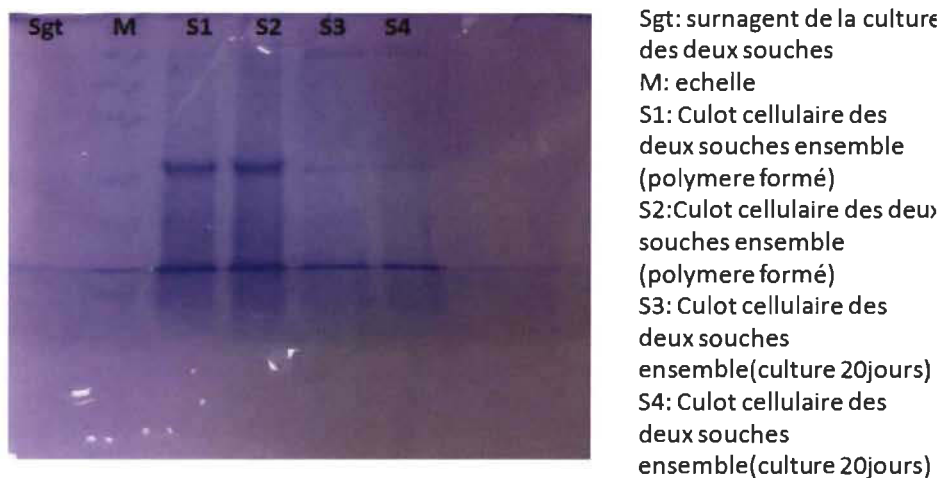
Identification des souches	Gram	Est	Lip	CMC	PASA	Xyl	Amyl	Prot	LiP	MnP	Lac	Oxy
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+

*Est*: esterase, *Lip*: lipase, *CMC*: carboxyl methyl cellulase, *PASA*: phosphoric acid swollen avicelase, *Xyl*: xylanase, *Amyl*: amylase, *Prot*: protéase, *LiP*: lignine peroxydase, *MnP*: manganese peroxydase, *Lac*: laccase, *Oxy*: oxydase, +: enzymatic activity is detected, -: no enzymatic activity detected.



**Figure B.2** Detection de la fluorescence (spectre d'émission après excitation à différentes longueur d'onde) de différents composés des huiles usées de moteur en présence de *Bacillus subtilis* après une culture de 7 jours de culture.

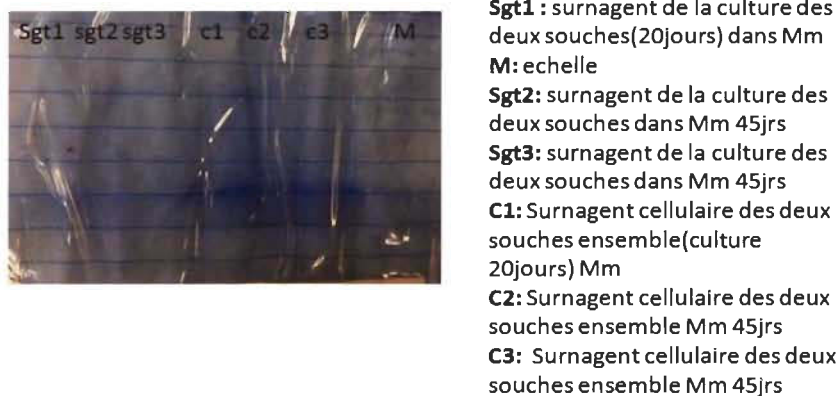




Ces cultures ont été réalisé dans milieu minimum avec 1%huile usée de moteur  
 S1et S2: duplicat  
 S3 et S4: duplicat

Activé  
 le 10/06/2018

**Figure B.3** Gel d'électrophorèse de protéines SDS-PAGE. Un gel d'électrophorèse des culots cellulaires des cultures des bactéries du consortium responsable de la production du biopolymère extracellulaire à différent temps de culture avant la formation du polymère.



**Figure B.4** Gel d'électrophorèse de protéines SDS-PAGE. Un gel d'électrophorèse les surnagents cellulaires des cultures du consortium des bactéries obtenues après 20 jours de culture et après 45 jours de culture.